



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis Doctoral

"Estudio del mecanismo de resistencia de plantas  
transgénicas híbridas de *Citrus sinensis* frente a *Citrus*  
*psorosis virus*"

---

Agustina De Francesco

(Directora: Maria Laura Garcia)

Año 2015







UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular  
(IBBM - CONICET - CCT - LA PLATA)



**Estudio del mecanismo de resistencia  
de plantas transgénicas híbridas  
de *Citrus sinensis*  
frente a *Citrus psorosis virus***



Trabajo de Tesis Doctoral  
Lic. Agustina De Francesco  
Dirección: Dra. Maria Laura García

2015



El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CCT-La Plata-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Laura García.



### **Mi reconocimiento,**

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por posibilitarme realizar el Doctorado en Ciencias Exactas dentro del ámbito de la Institución.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

A la EEA INTA Concordia, Entre Ríos y la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán, por el aporte en experimentos con cítricos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas otorgadas.

### **Mi agradecimiento,**

A la Dra. Maria Laura Garcia, por incorporarme a su equipo de trabajo desde la tesis de Licenciatura. Por dirigir toda mi carrera doctoral. Por su aliento y apoyo durante todos estos años. Por su enorme dedicación para la corrección de la tesis y por renovar la confianza para la siguiente etapa post doctoral.

A la Ing. Agr. Norma Costa, la Dra. Maria Inés Plata y el personal del CUIS, todos pertenecientes a la EEA INTA Concordia, por el aporte imprescindible de plantas, mantenimiento de las mismas, ayuda con los experimentos, transferencia de conocimiento, y por la cordialidad.

Al Dr. Atilio Castagnaro y su grupo en Tucumán, por la preparación de cítricos.

A mis compañeros del grupo virus vegetales del IBBM:

La Dra. Carina Reyes, por iniciarme en la investigación con cítricos y despertar mi vocación citrícola. Por todas sus enseñanzas científicas, incontables. Por acompañar todo mi crecimiento profesional, y por su cálida y oriental amistad. Gracias doc!

El Dr. Eduardo Peña, por los consejos en el breve tiempo en el que compartimos grupo, y la dosis diaria y vital de buen humor. Gracias Edu (ya no sos igual)!

El Dr. Gabriel Robles Luna, por la ayuda y los consejos en el laboratorio y la oficina. Por los azadazos y la amistad. Gracias Gabo, Grabo, Gabish!

La Lic. Eliana Ocolotobiche, por la década compartida de facultad, laboratorio, viajes, bicicleteadas, bailongos, chismes, etc, etc, etc. Gracias Pin!

La Lic. Belén Borniego, por tanta bondad y solidaridad. Por ser la "*lab manager*". Gracias Chiru!

La Ing. Agr. Luciana Ferrand, por darle el toque glamoroso al laboratorio. Por la onda y la amistad. Gracias genia!



Al Lic. Facundo Marmisolle, por compartir los almuerzos del comedor y la buena onda.  
Gracias Facundit!

A mis compañeros del IBBM:

A todos en general, por la calidez humana, que hace tan grato el día a día.  
A los CPAs por su gran mano en el laboratorio y el invernáculo.  
A los RPS, por el nanodrop, la real time, y la buena onda de sus becarios, muchos de ellos compañeros de toda la carrera.  
A los R3, por el espectrofotómetro y el ambiente jocoso.  
A los R4, por compartir Nitrógeno, equipos, reactivos, y el espíritu festivo de las nuevas generaciones.  
A los VacSal, por el lector de placas de ELISA y la vieja real time.  
A los VA, por ser el laboratorio hermano con el que intercambiamos absolutamente todos los equipos, reactivos y sobre todo amistad. Gracias a Carito y Pidrín, por ser además mis diseñadores gráficos y por tener esos corazones capricornianos tan locos y tan grandes.

A mi familia y amigos:

A mamá y Papá, por brindarme la educación y los valores que me permitieron desarrollarme en lo personal y lo profesional. Y por el amor, sobre todo.  
A mi hermana, por estar al lado mío desde su nacimiento hasta el día de hoy, y para siempre. Por su amor e incondicionalidad y por su apoyo imprescindible. Te amo Gor!  
A mi cuñado, por el cariño y el aguante. Grande Osky!  
A la abuela, la nona, los tíos, tías, primos y primas, por su cariño y apoyo a la Distancia.  
A Leo, por la paciencia infinita necesaria para soportar mi locura del final de la tesis, y por los cuidados, la compañía y el apoyo durante este período tan particular. Gracias To!  
A los amigos/hermanos, Lojo, Ale, Hebe, la barra de Giles, la barra de Pirovano, y todos los que acompañaron las distintas etapas, porque sin amistad, nada tiene sentido.

Gracias a todos!

ABREVIATURAS .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	5
I- Historia de la citricultura .....	7
II- Producción actual de cítricos en Argentina y el mundo .....	8
III- Propagación vegetativa de los cítricos por injerto .....	11
IV- Enfermedades de cítricos .....	12
V- Patógenos de cítricos transmitidos por injerto .....	13
VI- Psorosis de los cítricos .....	15
1. Historia .....	15
2. Incidencia en Argentina y en el mundo .....	16
3. Transmisión de la enfermedad .....	17
4. Agente causal .....	17
5. Rango de hospedantes y sintomatología .....	19
6. Control de la enfermedad .....	22
VII- Detección de CPsV y diagnóstico de Psorosis .....	22
VIII- Plantas resistentes a Virus .....	24
IX- Silenciamiento génico .....	25
X- Defensa antiviral mediada por silenciamiento .....	28
1. Recovery y VIGS .....	28
2- Mecanismo molecular de silenciamiento aplicado a defensa antiviral .....	28
3. Proteínas virales supresoras del silenciamiento antiviral .....	30
XI- Movimiento de los virus célula a célula y a larga distancia .....	31
XII- Diseminación del silenciamiento génico .....	34
1. Diseminación del silenciamiento .....	34
2. Propagación del silenciamiento a corta distancia .....	35
3. Propagación del silenciamiento a larga distancia .....	35
MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
I- Reactivos químicos .....	39
II- Aislamientos virales .....	39

III- Antisueros utilizados.....	39
IV- Cebadores.....	40
V- Minipreparación de DNA plasmídico.....	40
VI- Clonación y secuenciación.....	41
VII- Colony PCR.....	41
VIII- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	41
IX- Reacciones enzimáticas.....	42
IX- 1- Digestión con enzimas de restricción.....	42
IX- 2- Digestión con DNAsa.....	42
IX- 3- Reacción de transferencia de fosfatos con polinucleótido kinasa.....	42
X- Extracción y purificación de RNA.....	42
XI- Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos.....	43
XI-1- Síntesis de cDNA (reacción de transcripción reversa, RT).....	43
XI- 2- Reacción de PCR a tiempo final.....	43
XI- 3- Reacción de PCR semi cuantitativa.....	43
XI- 4- Reacción de PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	44
XI- 5- Preparación de sondas de DNA: marcación de oligonucleótidos con gamma 32P-ATP.....	44
XI- 6- Preparación de ribosondas marcadas con <sup>32</sup> P-UTP.....	44
XI- 7- Northern blot para la detección de siRNA.....	45
XII- TAS-ELISA-HRP.....	46
XIII- Reacción histoquímica para GUS (ensayo con gen marcador).....	46
XIV- Generación de plantas con simple o doble heterografting.....	46
XV- Inoculación viral mediante injerto.....	47
 OBJETIVOS GENERALES.....	 49
 Capítulo 1: Expresión de los transgenes ihpCP y CP en plantas transgénicas madres de Citrus sinensis y sus propagaciones.....	 51
 INTRODUCCIÓN.....	 53
OBJETIVOS.....	54
HIPÓTESIS.....	54



RESULTADOS.....	54
A. Análisis de las plantas madres de líneas ihpCP de <i>Citrus sinensis</i> L. Osb y sus propagaciones sobre <i>Citrus jambhiri</i> Lush como portainjerto.....	54
A.1. Selección de las líneas transgénicas ihpCP.....	54
A.2. Propagación de las líneas ihpCP.....	55
A.3. Expresión del gen reportero uidA en distintos tejidos ihpCP.....	56
A.4. Expresión del mRNA-ihpCP en tejido foliar de las plantas LR/ihpCP-10 y -15.....	58
A.5. Acumulación de siRNA-ihpCP en tejido foliar y tallo de las plantas LR/ihpCP-10 y -15.....	59
A.6. Especies de siRNA generadas en las plantas ihpCP.....	61
A.7. Acumulación de mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en el pie LR.....	62
B. Análisis de la línea CP de <i>Citrus sinensis</i> L. Osb sobre <i>Citrus jambhiri</i> Lush como portainjerto.....	63
B.1. Expresión del mRNA-CP.....	64
B.2. Acumulación de siRNA-CP.....	66
CONCLUSIONES.....	67
DISCUSIÓN.....	68
PERSPECTIVAS.....	69

Capítulo 2: Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP y silenciamiento génico del gen <i>cp</i> a través del injerto.....	71
---	----

INTRODUCCIÓN.....	73
OBJETIVOS.....	73
HIPÓTESIS.....	73
RESULTADOS.....	74
A. Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP a través del injerto.....	74
A.1. Preparación del sistema de estudio por heterografting: Plantas LR/ihpCP/NDP.....	74
A.2. Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP desde el puente hacia el pie y hacia la copa en las plantas LR/ihpCP/NDP.....	75
A.2.1. desde el puente ihpCP hacia el pie LR.....	75
A.2.2. desde el puente ihpCP hacia la copa NDP.....	76
B. Silenciamiento génico del gen <i>cp</i> a través del injerto.....	78

B.1. Preparación del sistema de estudio por heterografting: plantas LR/ihpCP/CP .....	78
B.2. Cuantificación del mRNA-CP en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP .....	79
B.3. Determinación de siRNA en la copa CP de las plantas LR/ihpCP/CP .....	81
C. Análisis del nivel de expresión del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en los puentes ihpCP, y silenciamiento génico del gen cp en las copas CP, en función del desarrollo foliar .....	83
CONCLUSIONES .....	85
DISCUSIÓN .....	86
PERSPECTIVAS .....	88
 Capítulo 3: Efecto de la transmisión del silenciamiento génico en las copas NDP y CP sobre la resistencia a CPsV .....	91
 INTRODUCCIÓN .....	93
OBJETIVOS .....	93
HIPÓTESIS .....	94
RESULTADOS .....	94
A. Evaluación de la resistencia de los puentes ihpCP y de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP. Efecto de la transmisión del silenciamiento génico en las copas NDP y CP sobre la resistencia a CPsV .....	94
A.1. Evaluación de la infección con CPsV en los puentes ihpCP-10 y -15 en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP .....	94
A.2. Análisis de la resistencia frente a CPsV de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP .....	102
B. Determinación de la estabilidad de la resistencia de las plantas LR/ihpCP frente a CPsV .....	109
C. Determinación del grado de resistencia de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP frente a CPsV con inoculación previa al heterografting .....	113
CONCLUSIONES .....	115
DISCUSIÓN .....	115
PERPECTIVAS .....	117

Capítulo 4: Desafío de las líneas ihpCP-10 y -15 con un aislamiento heterólogo de psorosis B .....	119
--	-----

INTRODUCCIÓN .....	121
OBJETIVOS .....	122
HIPÓTESIS .....	122
RESULTADOS .....	123
A. Ensayo de infección de las líneas ihpCP-10 y -15 con el aislamiento CPsV 189-34 .....	123
B. Evaluación de la resistencia de las líneas ihpCP-10 y 15 frente a PsB .....	125
CONCLUSIONES .....	130
DISCUSIÓN .....	130
PERSPECTIVAS .....	132

Capítulo 5: Desarrollo de una nueva técnica de detección de la enfermedad psorosis de los cítricos y transgenes derivados de CPsV mediante RT-qPCR .....	133
--	-----

INTRODUCCIÓN .....	135
OBJETIVOS .....	135
HIPÓTESIS .....	135
RESULTADOS .....	136
A. Diseño de cebadores, desarrollo de la RT-qPCR y análisis de la especificidad .....	136
B. Análisis de la sensibilidad de RT-qPCR para CPsV .....	140
C. Comparación de la RT-qPCR con el TAS-ELISA .....	141
D. Detección de diferentes aislamientos de CPsV .....	142
E. Detección en muestras de campo .....	144
F. Detección de fragmentos derivados del gen cp de CPsV en cítricos transgénicos .....	146
CONCLUSIONES .....	146
DISCUSIÓN .....	146
PERSPECTIVAS .....	148

CONCLUSIONES GENERALES.....	149
REFERENCIAS.....	151
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	167

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
CP	Proteína de la cápside
cDNA	ácido 2' desoxirribonucleico complementario
cm	centímetro(s)
CPsV	<i>Citrus psorosis virus</i>
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DO	densidad óptica
dpi	días post-inoculación
EDTA	<i>etilen diamine tetra acetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	gramo(s)
$\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP	gamma <sup>32</sup> P-adenosina 5'-trifosfato
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	<i><math>\beta</math>-glucuronidase</i>
h	hora(s)
HCl	Ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
hpRNA	RNA tipo <i>hairpin</i>
ihpRNA	RNA tipo <i>intron.-hairpin</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltons
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potasio monobásico
Km	Kanamicina

KOH	hidróxido de potasio
LB	<i>Luria Bertoni</i>
LR	Limón Rugoso
LR/NDP	Injerto de un pie de LR y una copa de Naranja Dulce Pineapple
M	molar
$\mu\text{Ci}$	microcurie
$\mu\text{F}$	microfaradios
$\mu\text{g}$	microgramo(s)
$\mu\text{l}$	microlitro(s)
$\mu\text{M}$	micromolar
min	minuto(s)
miRNA	micro-RNA(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
mpi	meses post-inoculación
mRNA	RNA mensajero
N	normal
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	fosfato de sodio dibásico
NaCl	cloruro de sodio
NaI	ioduro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NBT	nitro blue tetrazolium
NDP	Naranja Dulce Pineapple
ng	nanogramo(s)
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	nanómetro(s)
nt	nucleótido(s)

OPD	orto-fenilendiamina
$\Omega$	omhs
pb	pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>Pathogen-Derived Resistance</i>
PEG	polientilenglicol
pH	Potencial Hidrógeno
PM	peso molecular
% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen
PsA	psoriasis de tipo A
PsB	psoriasis de tipo A
PTGS	<i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>
PVP	polivinilpirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RNasin®	<i>ribonuclease inhibitor</i>
RT	<i>reverse transcription</i>
SB	<i>Sample buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
seg	segundo(s)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>salt sodium citrate</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA

TAS	Triple Antibody Sandwich
TBE	Tris-borato-EDTA
Taq pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA de transferencia
T7	RNA polimerasa del fago T7
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	$\alpha^{32}\text{P}$ -citosina 5'-trifostato
ubqt	ubiquitina
UV	ultravioleta
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido
X-Gluc	<i>5-Bromo-4cloro-3-indolil-<math>\beta</math>-D-glucuronic acid cycloheximide salt</i>



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

- I- Historia de la citricultura
- II- Producción actual de cítricos en Argentina y el mundo
- III- Propagación por injerto
- IV- Enfermedades de cítricos
- V- Patologías transmisibles por injerto
- VI- Psorosis
- VII- Detección de CPsV y diagnóstico de Psorosis
- VIII- Plantas resistentes a Virus
- IX- Silenciamiento génico
- X- Defensa antiviral mediada por silenciamiento
- XI- Movimiento de los virus célula a célula y a larga distancia
- XII- Diseminación del silenciamiento génico



## I- Historia de la citricultura

El término cítrico se refiere al conjunto de especies e híbridos que pertenecen a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, incluidos en la familia de las Rutáceas, también llamadas auranciáceas o hesperídeas. Dentro del género *Citrus* (C.) se consideran tres especies verdaderas: *C. reticulata* (mandarina), *C. grandis* (pomelo) y *C. médica* (cidro), siendo todas las restantes híbridos de estas tres (Moore 2001).

Los cítricos son los árboles frutales más viejos del mundo. Los primeros registros de uso humano del cultivo de cítricos se remontan a 2100 años AC. Por esta razón ha sido difícil determinar su origen.

De todas las hipótesis formuladas sobre la historia y origen geográfico de los cítricos, la más concordante es la que enuncia que todas las especies pertenecientes a cítricos y géneros relacionados se originaron en la zona tropical y subtropical del Sudeste asiático (India nororiental, sur de China, Archipiélago Malayo) y luego se extendió a otros continentes (Nicolisi 2007). Las rutas exactas de dispersión de los cítricos desde su origen son aún desconocidas.

La primera referencia escrita sobre cítricos se halló en Sánscrito, antes del 800 A.C, seguido de referencias en la literatura china, griega y romana. Todas las culturas y civilizaciones primitivas de Asia y Europa manifestaron interés por estos cultivos. Durante siglos los usos humanos de los cítricos sólo se circunscribían a la cosmética.

Se cree que algunos tipos de cítricos, como limones, naranjas y limones agrios, se propagaron lentamente entre los años 500 y 1300 D.C, a través de amplias áreas, por las sucesivas oleadas de invasores y viajeros musulmanes, ejércitos, los comerciantes árabes, las cruzadas, entre otras causas (Moore 2001). Posteriormente los cítricos llegaron a América, traídos por los conquistadores europeos (españoles y portugueses) hacia el 1500. Comenzaron a diseminarse por el Caribe y Brasil, y alcanzaron el nuevo continente en su totalidad (Figura 1).

Hacia el siglo XVIII aparecieron los plantines comerciales y aumentó el consumo de cítricos como fruta comestible. La primera especie de interés comercial para estos usos fue el Naranja Dulce. Hacia el siglo XIX se masificó el consumo mundial de cítricos, y los mayores países productores comenzaron a exportar fruta fresca (Navarro 2012). La producción masiva requirió de investigaciones científicas tendientes al mejoramiento de los frutos, y la resolución de problemas ligados a patógenos.

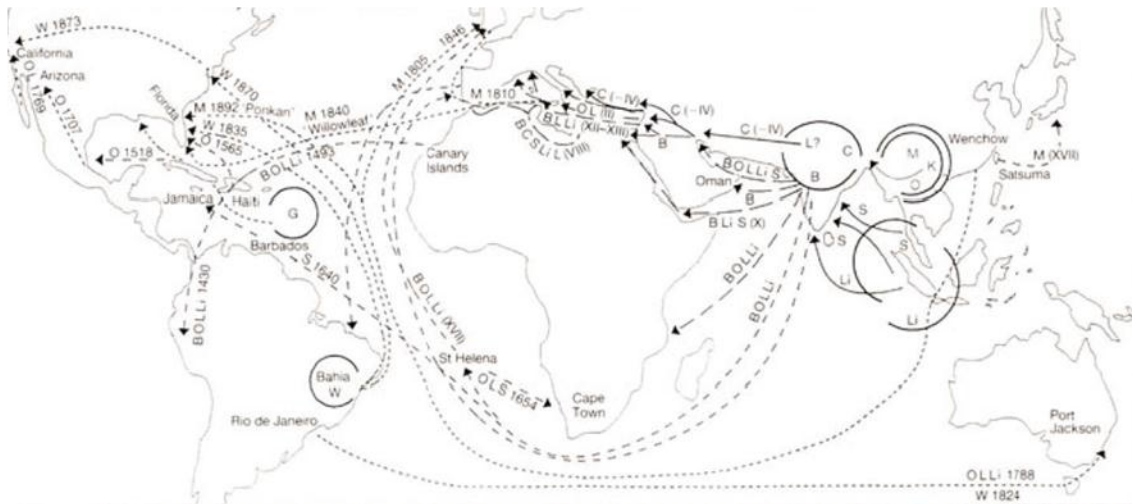


Figura 1. Rutas que muestran la supuesta distribución geográfica de los cítricos desde su centro original (tomada de Nicolisi 2007).

Actualmente los cítricos se cultivan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud Norte y Sur. Fueron y son apreciados tanto por su calidad alimenticia, como fuente de fragancias y por su uso medicinal.

## II- Producción actual de cítricos en Argentina y el mundo

En la actualidad se producen más de 123 millones de toneladas de cítricos en el mundo. Estos frutos son cultivados en más de 140 países, en condiciones muy diversas. Para ello la investigación científica propició la adaptación del cultivo a suelos alcalinos, salinos, climas diversos, etc. (Navarro 2012).

Los países más importantes productores de cítricos son actualmente Argentina, Brasil, China, Egipto, España, Estados Unidos, Italia, México, Turquía y Sudáfrica. En muchos países se consume preferentemente la fruta fresca pero en algunos, como Brasil y Estados Unidos, la mayor parte de la producción se comercializa como jugo procesado, pasteurizado o concentrado (Castañer 2003).

El primer productor mundial de cítricos es China con más de 27 millones de toneladas (M t) anuales, a él le siguen Brasil (17 M t) y Estados Unidos (10 M t). Argentina es el octavo productor mundial, con un volumen anual de alrededor 2 millones de toneladas (FEDERCITRUS 2014). La tabla 1 representa la producción 2012/2013 y la estimación productiva del 2014 de los principales países citrícolas (FEDERCITRUS 2014).

<b>Países</b>	<b>2012/2013</b>	<b>2014</b>
China	27.370	29.570
Brasil	16.361	17.750
Estados Unidos	10.136	9.147
México	6.370	6.320
España	6.312	6.299
Turquía	3.356	3.575
Italia	3.167	3.173
<b>Argentina</b>	<b>2.824</b>	<b>1.670</b>
Sudáfrica	2.457	2.532
Egipto	2,450	2,570

Tabla 1. Producción de frutas cítricas frescas en países seleccionados año 2012/2013 y estimación 2014 (en millones de toneladas).

Con 50,4 millones de toneladas, la naranja es la especie de mayor producción mundial, con el 60,7% del volumen total de cítricos, le siguen la mandarina con 24,5 millones de toneladas, y el limón con 7,1 millones de toneladas (FEDERCITRUS 2014).

En nuestro país se produce mayormente limón, mandarina, naranja y pomelo y en menor escala comercial lima, que en las estadísticas mundiales se la incluye en los limones. Existen dos regiones geográficas productoras de cítricos: El Noreste Argentino (NEA), que incluye la región mesopotámica (Entre Ríos, Corrientes y Misiones) y algunas ciudades del Norte de la Provincia de Buenos Aires, como San Pedro; y el Noroeste (NOA), comprendiendo las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy. El NEA se especializa en producir principalmente Naranja y mandarina, mientras que el NOA hace lo propio fundamentalmente con limón y pomelo. En La figura 2 muestra una plantación de naranjos del NEA.



Figura 2. Plantación de naranjas en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concordia (tomada por la Ing. Norma Costa).



La principal especie producida en Argentina es el limón con más de 1,4 millones de toneladas, le siguen la naranja, la mandarina y el pomelo. La producción nacional representa el 3,21% de la producción mundial; pero en el caso particular del limón, el volumen producido en el país equivale al 20,8% de la producción mundial, liderando la exportación de esta fruta (FEDERCITRUS 2014).

La producción citrícola presenta tres etapas determinantes a lo largo de su cadena de valor: Producción primaria, producción industrial y comercialización. Las cifras recolectadas indican que existen 5300 productores en la primera etapa, 600 plantas de empaque de fruta y 20 plantas fabriles productoras de jugo en la segunda (CFI 2014). La industrialización de cítricos está encabezada por Brasil que elabora 12,2 millones de toneladas anuales, seguido por Estados Unidos que elabora 7,6 millones de toneladas y en tercer lugar se encuentra la Argentina que industrializa 1,4 millones de toneladas (más del 75% corresponde al limón) (CFI 2013). La figura 3 muestra un sector de una plantinera modelo de la empresa Citrosol, en el estado de San Pablo (Brasil).



Figura 3. Fotografía tomada en un sector de la plantinera de cítricos de la empresa Citrosol (visita post conferencia del XVIII Congreso de la IOCV, Araraquara, San Pablo, Brasil, 2010).

De acuerdo a estimaciones del SENASA, la actividad citrícola argentina concentra alrededor de 5.300 productores distribuidos en 10 provincias, de las cuales 6 acaparan al 97% de estos. Existen en el país un total de 442 empaques de frutas cítricas, de los cuales 112 son específicos para exportación. Para el procesamiento de la fruta hay 19 plantas industriales. El subsector citrícola ocupa un total de 100.000 trabajadores permanentes como temporarios.

El volumen total de cítricos frescos exportado por Argentina es de aproximadamente 528.000 t, que representa el 4,1% del comercio mundial de cítricos frescos. En el caso de cítricos industrializados, las exportaciones argentinas representan, en relación con las exportaciones mundiales: el 0,3% de los derivados de la naranja; el 2,2% de la mandarina; el 12,3% del pomelo; y el 55,6% del limón (FEDERCITRUS 2013).

### **III- Propagación vegetativa de los cítricos por injerto**

El injerto es una técnica muy utilizada para la propagación de árboles frutales. Consiste en la unión de tejidos de dos o más plantas distintas para constituir un individuo autónomo. A esta clase de individuos se les llamó plantas híbridas en el título de esta tesis, aunque esta expresión no es la más pertinente, ya que se confunde con las especies cítricas híbridas, que son el resultado del cruzamiento de dos especies por ejemplo, con fines de mejoramiento genético. Las partes elementales de una planta híbrida por injerto son: el pie o portainjerto, que aporta las raíces y el tronco; y la copa de la que se obtienen los frutos de interés.

Originariamente los árboles cítricos eran crecidos como plántulas de semilla. Pero no todas las especies crecen con igual vigor, y con igual adaptabilidad al suelo y las condiciones de cultivo. Por ejemplo en España en el siglo XVIII, se instalaron las primeras plantaciones comerciales de naranjo dulce, y en el transcurso de unos pocos años todas las plantas murieron. Allí descubrieron que esta especie podía plantarse con un naranjo amargo como pie (Navarro 2012). Hoy se sabe que la propagación sexual o por semilla genera una gran variabilidad no deseada para su comercialización (Stoltz and Strang 2005). Desde aquel momento y hasta la actualidad, todos los cultivares comerciales se originan como yemas injertadas en pies, lo que implicó un avance cualitativo en el cultivo.

Las especies que se utilizan como pie son seleccionadas por su compatibilidad con la especie utilizada como copa y aun más importante por su tolerancia a factores del suelo, plagas y enfermedades, pero además afectan el rendimiento y calidad de los frutos. La mayoría de las copas y pies utilizados comercialmente pertenecen al género *Citrus* exceptuando los kumquats (*Fortunella* sp.) y las naranjas trifoliadas (*Poncirus trifoliata*) que se utilizan solamente como pie.

La técnica de injerto aporta grandes beneficios para el manejo del cultivo; ya que permite el cambio de copa, es decir el reemplazo de una especie frutal por otra de mayor interés comercial, utilizando los pies ya desarrollados.

Existen diferentes técnicas de injerto, dependiendo del pie o patrón, del material a injertar (yema, varetta, material foliar, etc) y del objetivo que se persiga, y que serán desarrollados en Materiales y Métodos. La figura 4 muestra las partes y pasos involucrados en el injerto de yema.

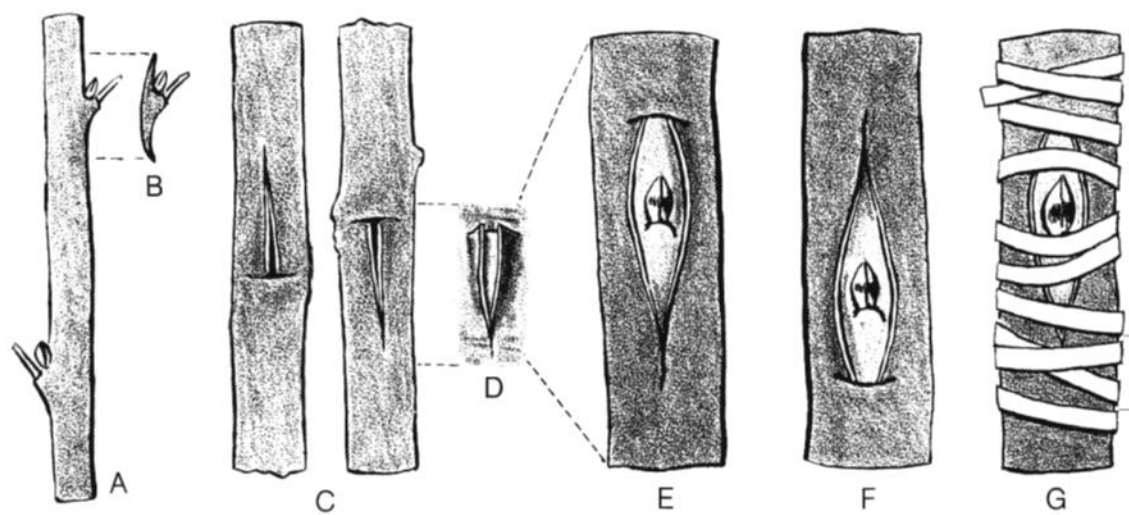


Figura 4. (a) vareta o estaca con yemas brotando. (b) zona de la yema que ya originó un brote. (c) corte en "T" invertida y "T" estándar. (d) Corteza abierta lista para injertar la yema. (e) y (f) yema insertada en ambos tipos de corte en "T". (g) injerto cubierto con la tira de sujeción de goma (tomado de Stoltz and Strang 2005).

Además de sus usos en la propagación de frutales en el campo, el invernáculo, e *in vitro*, el injerto ha aportado una herramienta metodológica para estudiar el transporte de moléculas a larga distancia, y el silenciamiento génico, como serán abordados en este trabajo de tesis.

#### IV- Enfermedades de cítricos

El buen desarrollo de las plantas es de particular interés para aquellos que están relacionados de manera bastante directa con su crecimiento y la producción y distribución de sus productos. El crecimiento y el rendimiento de las plantas dependen de la disponibilidad del agua y de los nutrientes del suelo donde se desarrollen y del mantenimiento, dentro de ciertos límites, de algunos factores del ambiente como la temperatura, la luz y la humedad. Dependen también de la protección que tengan contra el ataque de los parásitos. Todo lo que afecta la salud de las plantas influye en su crecimiento, lo cual disminuye de manera notable en la producción.

Las plantas se mantienen sanas o normales cuando llevan a cabo sus funciones fisiológicas hasta donde les permite su potencial genético. Se dice que las plantas presentan enfermedad cuando una o varias de sus funciones son alteradas por los organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio (Agrios 1996).

Las enfermedades de plantas pueden presentarse por un estrés biótico o abiótico, siendo las primeras causadas por microorganismos que infectan a la planta; y las segundas, por deficiencias nutricionales u otras condiciones de estrés que derivan de factores ambientales. En el caso particular de las enfermedades de cítricos, se han descrito enfermedades causadas por bacterias, fitoplasmas, hongos, nemátodos, virus



y viroides, dentro del primer tipo; y causadas por condiciones ambientales adversas, defectos genéticos o nutricionales y deficiencias en el cultivo como puede ser la aplicación inadecuada de compuestos químicos, en el segundo tipo.

Se ha caracterizado un amplio rango de patógenos que afectan cítricos, y desarrollan enfermedades en ellos, además de otros organismos no identificados, algunos de los cuales inducen enfermedades conocidas como "declinamientos". En algunos casos el cuadro de sintomatología es útil para la detección temprana de la enfermedad y en otros casos la correlación entre síntomas y enfermedad no es tan directa, y es necesario acudir a análisis de laboratorio para realizar el diagnóstico. Aún hoy, puede ser necesario un diagnóstico biológico, mediante la transmisión del agente causal desde una planta enferma a una sana o una planta indicadora (Derrick and Timmer 2000).

De las enfermedades que afectan actualmente a la producción de cítricos, las más importantes son causadas por bacterias. De ellas, la más destructiva es la enfermedad emergente HuangLongBing (HLB), causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, y se encuentra ampliamente distribuida en países vecinos como Brasil (Bové 2006, (Wang and Trivedi 2013). En Argentina recientemente se han reportado casos de HLB, y el psílido vector, *Diaphorina citri*, se halla presente, hecho que aumenta el riesgo de dispersión. También es importante la presencia de la canchrosia de los cítricos, enfermedad bacteriana endémica en nuestro país, causada por patovares de *Xanthomonas axonopodis* ha sido y continúa siendo de gran preocupación para productores y gobiernos. Entre las lesiones causadas por canchrosia se observan manchas, pústulas corchosas, necrosis y muerte celular en hojas, tallos y frutos. Estas lesiones no alteran necesariamente la calidad interna de los frutos, pero disminuyen significativamente su valor en el mercado debido al aspecto de la cáscara (Gottwald 2000). Otra enfermedad bacteriana importante para la citricultura de Argentina y Brasil, es la clorosis variegada de los cítricos (CVC), causada por *Xylella fastidiosa*, restringida a tejido del xilema (Timmer 2002). Esta enfermedad se transmite mediante insectos vectores que se alimentan del xilema de la planta, afectándola completamente en estadios avanzados donde los frutos parecen quemados por el sol, con tamaño reducido, endurecidos y jugos amargos y no se pueden comercializar (FAO 2003).

Además de las enfermedades bacterianas mencionadas, la citricultura argentina se ve afectada por un amplio rango de hongos, virus y viroides. Los dos últimos se detallan en el siguiente apartado.

## **V- Patógenos de cítricos transmitidos por injerto**

Debido al manejo del cultivo de los cítricos, las enfermedades transmisibles por injerto son las más importantes. Estas enfermedades fueron muy propagadas años atrás, produciendo epidemias, cuando aún no se habían implementado programas de certificación de yemas para viveristas y productores, y de buenas prácticas de injerto. Los agentes causales más comunes transmitidos de esta manera pueden ser virus y viroides, y en menor medida, bacterias y micoplasmas. Las enfermedades conocidas en este grupo están listadas en la Tabla 2 (Durán Vila y Moreno 2000).

Enfermedad	Agente causal	Género	Transmisión por vectores
<b>Viroides</b>			
Caquexia	<i>Hop stunt viroid</i> (HSVd)	<i>Pospiviroid</i>	-
Exocortis	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	<i>Pospiviroid</i>	-
Bolsas de goma	Probablemente un viroide	?	-
Corteza gomosa	Probablemente un viroide	?	-
<b>Virus</b>			
Enanismo del mandarino satsuma	<i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV)	<i>Sadwavirus</i>	?
Manchado foliar de los cítricos	<i>Citrus leaf blotch virus</i> (CLBV)	?	?
Hoja rasgada	<i>Citrus tatter leaf virus</i> (CTLV)	<i>Capilovirus</i>	-
Hoja rugosa	<i>Citrus leaf rugose virus</i> (CiLRV)	<i>Ilarvirus</i>	-
Leprosis	<i>Citrus leprosis virus</i> (CiLV)	<i>Rhabdovirus</i>	+
Mosaico amarillo	<i>Citrus mosaic virus</i> (CMBV)	<i>Badnavirus</i>	?
Protuberancias nerviales -agallas en la madera	Probablemente un luteovirus	?	+
Psorosis	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)	<i>Ophiovirus</i>	?
Tristeza	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	<i>Closterovirus</i>	+
<i>Citrus variegation</i>	<i>Citrus variegation virus</i> (CVV)	<i>Ilarvirus</i>	-
Concave gum	Etiología desconocida/posiblemente virus		-
Cristacortis	posiblemente virus		-
Enanismo clorótico	posiblemente virus		+
Impietratura	posiblemente virus		-
Incompatibilidad sobre limonero rugoso	posiblemente virus		?
Manchas anulares amarillas	posiblemente virus		-
<b>Bacterias</b>			
Clorosis variegada	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella</i>	+
Huanglongbing	<i>Candidatus Liberobacter</i> sp.		+
<b>Micoplasmas</b>			
Stubborn	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Spiroplasma</i>	+
Escobas de bruja de la lima	<i>Candidatus Phytoplasma aurantifolia</i>		?
Blight	Etiología desconocida		-

Tabla 2. Enfermedades transmisibles por injerto más importantes de los cítricos agrupadas por tipo de agentes causales (datos tomados de Duran-Vila y Moreno, 2000)

Las enfermedades transmisibles por injerto se hallan entre las principales causas de pérdidas económicas del cultivo de cítricos. Años atrás, se estimaban pérdidas en la producción mundial del 15 al 25% causadas por este tipo de enfermedades (Moreno y

Roistacher, 1990). En algunos casos, la infección de los árboles puede provocar pérdidas directas del cultivo por cese de la producción, así como ejercer daños indirectos provocando pérdida de vigor y de longevidad de la planta, decaimiento del crecimiento, disminución del tamaño y la calidad de los frutos, o restricciones en la elección de portainjertos.

Algunas de estas enfermedades se pueden controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal propagado (Navarro 1993; Navarro et al. 2002). Mientras que otras, además de propagarse con el material vegetal, se pueden transmitir mecánicamente con herramientas de corte o mediante insectos que actúan como vectores del agente patógeno, dificultando el control de la enfermedad. Moreno y Roistacher (1990) afirmaban que en muchos países como la Argentina casi la totalidad de las plantas adultas estaban afectadas por alguna virosis. Una de las más importantes ha sido la psorosis de los cítricos, tratada en esta tesis, que durante décadas fue una epidemia difundida principalmente debido a la propagación de yemas infectadas.

Desde hace aproximadamente 20 años, se está aplicando en Argentina un Programa Nacional de Certificación de yemas denominado PROCITRUS (Programa de Mejoramiento Varietal y Sanitario en Citrus), impulsado por el CUIS (Centro Único de Introducción y Saneamiento) de la Estación INTA Concordia, Entre Ríos, que ha sido sumamente exitoso, y redujo sensiblemente la incidencia de las enfermedades transmisibles por injerto a campo (Costa et al. 2004).

## **VI- Psorosis de los cítricos**

### **1. Historia**

La psorosis es una de las enfermedades de cítricos más antiguas ya que fue la primera virosis de cítricos descubierta de la historia. La primera descripción de la enfermedad data de fines de Siglo XIX (Swingle y Weber 1896), en la que se alude al descamado del tronco, síntoma que le da el nombre a la enfermedad (por analogía a la psoriasis humana).

Psorosis también fue la primera en la que su síndrome completo fue reproducido a partir de su transmisión por injerto, asociándole una naturaleza probablemente viral a la enfermedad (Fawcett 1932). En aquel trabajo también se estableció una correlación entre los síntomas de mosaico observados en hojas jóvenes de árboles de cítricos y las lesiones corticales de troncos y ramas viejas (Roistacher 1993). Pocos años después se describieron dos tipos de psorosis: la psorosis A (PsA), caracterizada por la descamación lenta del tronco y las ramas principales, y la psorosis B (PsB), más agresiva, donde los síntomas de descamación se producen más rápidamente incluso en ramas delgadas. Además, se asociaron otros síntomas a esta forma más virulenta de psorosis, como manchas cloróticas persistentes en hojas adultas y anillos incoloros en frutos (Fawcett y Klotz 1938). Más tarde se demostró que ambos tipos de psorosis, A y B, no eran diferentes enfermedades sino que estaban relacionadas. Esto se realizó mediante ensayos de protección cruzada, donde la corteza (sin síntomas) proveniente



de un árbol infectado con PsA injertada a un plantín de naranjo dulce de invernáculo era capaz de proteger contra el desafío posterior con inóculo de PsB (Wallace 1957). A partir de ese momento se utilizó este ensayo de protección cruzada para diagnosticar PsA (aquella que protege a la infección por PsB), y estudiar su relación con otras enfermedades (Roistacher 1993; Roistacher et al. 2000).

En aquel entonces las plantas infectadas con Ps presentaban un gran conjunto de síntomas, provocados por varios agentes causales, de etiología desconocida, pero que presentaban síntomas similares a Ps, por lo que se lo denominó "grupo psorosis". Posteriormente, una vez aislados sus agentes causales, fueron identificadas e individualizadas en las hoy conocidas como PsA, PsB, *concave gum*, *citrus variegation* y *Citrus ringspot* (Wallace and Drake 1968). Todas ellas tenían en común el hecho de que eran transmisibles por injerto e inducían manchas y flecos cloróticos en hojas jóvenes de plantas indicadoras inoculadas en invernadero. La impietratura y cristacortis, otras dos enfermedades de los cítricos, también fueron en ese tiempo consideradas dentro del grupo psorosis (Roistacher et al. 2000). *Citrus ringspot*, como se había denominado en USA, y psorosis causaban un cuadro de síntomas muy similares. En plantas indicadoras inoculadas con aislamientos de ringspot, las hojas jóvenes sufrían reacción de "shock" y se necrosaban los primeros brotes, después de la inoculación, y también ambas eran transmisibles mecánicamente a *Chenopodium quinoa* (Garnsey y Timmer 1988; Derrick et al. 1991; da Graca et al. 1991; Garcia et al. 1994). Sólo después de identificar los agentes causales se confirmó que se trataba del mismo patógeno (Derrick et al 1988; Garcia et al 1991a, 1994).

## 2. Incidencia en Argentina y en el mundo

Los estudios epidemiológicos realizados para psorosis datan de 1990 (Danós 1990), cuando aún no se contaba con un método de diagnóstico rápido y sencillo que permitiera determinaciones masivas de muestras de campo. Sumado a esto, el desarrollo de la enfermedad es lento y el intervalo ocurrido entre la infección y la aparición de los síntomas, que fuera la manera de determinar su presencia, es de 10 a 15 años. Esto también fue un factor importante cuando por ausencia de síntomas, los agricultores propagaban yemas infectadas con psorosis, lo que influyó en la incidencia de la enfermedad en el cultivo de cítricos.

A lo largo de la historia, se han observado síntomas de psorosis en muchas zonas cítricas del mundo. La distribución de la enfermedad está bien documentada y confirmada en América, África, Asia y en la costa mediterránea europea. En muchos países la introducción de variedades de yemas no autóctonas infectadas, pero comercialmente importantes, provocó el desarrollo de la enfermedad, ocasionando grandes pérdidas en Estados Unidos, Argentina, Brasil, Israel, España, China, Uruguay y Egipto (Wallace 1978). Posteriormente se aplicaron programas de saneamiento basados en la utilización de yemas libres de virus y plantas de origen nucelar (Navarro et al. 1980) a fin de obtener cítricos libres de la enfermedad. Estos programas han logrado controlar la psorosis en la mayoría de los países donde se han aplicado. Así también, en el NOA, NEA y en la zona de San Pedro (Provincia de Buenos Aires), el programa de saneamiento implementado ha sido efectivo.

Sin embargo, aún con el control del material libre de patógenos la enfermedad continuaba causando importantes pérdidas económicas (Larocca 1985; Danós 1990). En estas regiones, frecuentemente se encontraban árboles con descamación en el tronco, incluso en plantas de semilla de origen nucelar, resultando así la psorosis, una epidemia que fue muy difícil de erradicar. Después de más de 20 años de la aplicación del programa de saneamiento, la enfermedad ha sido controlada. Sin embargo, aún se pueden encontrar aisladamente, individuos que presentan la enfermedad (Zanek et al. 2006), lo que hace sostener la sospecha de un vector. Sumado a esto, aunque en un reporte de 1990, Danós concluye que psorosis se disemina árbol a árbol, indicando que la enfermedad podría ser transmitida por un vector natural, mientras que, controversialmente, en otros países la enfermedad había sido erradicada completamente, sin reportes ni sospechas de un vector (Alioto et al. 2007).

Más allá de la situación epidemiológica de nuestro país, la psorosis aun hoy es motivo de estudio en diversos países, ya que existen reportes recientes de psorosis en países que hasta ahora no habían registrado casos de esta enfermedad, como Cuba (Velázquez et al. 2005), Egipto (Ghazal et al. 2008), Turquía (Kayim 2010), Japón (Ito et al. 2011) y Siria (Abou Kubaa et al. 2014); e incluso algunos, como es el caso de México, poseen estudios más actuales de incidencia de psorosis (Iracheta-Cárdenas et al. 2004).

### 3. Transmisión de la enfermedad

No hay evidencia experimental que la enfermedad pueda ser transmitida por polinización de flores o a través de las semillas (Roistacher, 1993). Hay viejos estudios epidemiológicos realizados en Argentina y Texas (EE.UU.) sugiriendo que la enfermedad se disemina naturalmente (Pujol y Beñatena 1965; Beñatena y Portillo 1984; Danós 1990; Gottwald et al. 2005), y si bien aún no se ha podido confirmar el vector asociado a esta dispersión natural, estudios preliminares indican que uno de los vectores podría tratarse de *Toxoptera citricida*, presente tanto en el NOA como en el NEA, también vector de CTV (Costa et al. 2013).

La existencia de un vector podría ser la causa de encontrar aún hoy plantas enfermas en regiones donde se aplica el programa de certificación de yemas implementado en todo el país (Zanek et al., 2006). En Texas, EEUU, recientemente fueron reportados datos preliminares de la presencia de psorosis (Palle et al. 2004) cuya dispersión se asocia a un hongo de suelo, *Olpidium brassicae*, pero estos datos no fueron confirmados. Paralelamente, el vector de otros virus de la misma familia que el causal de psorosis es este hongo (Lot et al. 2002).

Por lo tanto, podemos decir que habría al menos dos vectores candidatos, *Toxoptera citricida* y *Olpidium brassicae*, o que ambos lo sean.

### 4. Agente causal

A partir de diferentes aislamientos de psorosis se determinó que el agente causal de la enfermedad es un virus, Citrus psorosis virus (CPsV) (da Graça et al. 1991; Derrick et

al. 1988; Garcia et al. 1991a; Navas-Castillo y Moreno 1993). Se encontró que el virus presenta una morfología circular, con nucleocápsides de 3 nm de diámetro, que pueden colapsar *in vitro* para formar estructuras cerradas, parcialmente ramificadas de 9 nm de diámetro y alrededor de la mitad de la longitud del contorno circular (García et al. 1994; Milne et al. 2000). Estos estudios morfológicos, la naturaleza de su genoma y los hospedantes que ataca, colocaron a CPsV con miembro tipo de un nuevo género, *Ophiovirus*, familia *Ophioviridae* (llamados así por la forma sinuosa o de serpiente) dentro del Orden *Mononegavirales* (García et al. 1994; Milne et al. 2000).

El virión está compuesto por nucleocápsides desnudas, es decir no envueltas, circulares de 3 nm de diámetro (Figura 5), las cuales adoptan varias conformaciones (desde muy enrollada hasta una forma sinuosa circular abierta), de dos tamaños.

Las partículas más cortas poseen una longitud estimada entre 690-760 nm, y las largas son alrededor de 5 veces mayores (aprox. 2000 nm) (García et al. 1994). Las partículas son muy frágiles y su integridad (infectividad) depende de varios factores como el pH, fuerza iónica y agentes reductores (García et al. 1991a).

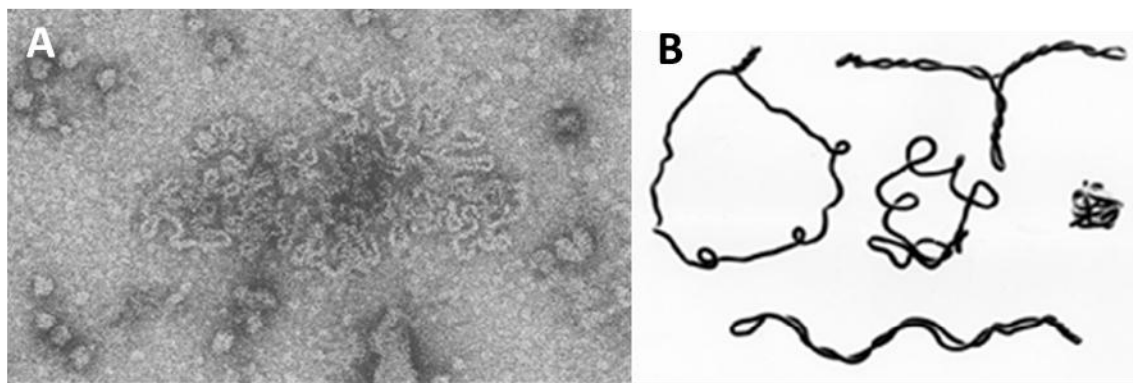


Figura 5.A. Micrografía electrónica de CPsV, donde se evidencian las distintas partículas virales y la morfología circular y sinuosa. B. Representación de las diferentes conformaciones que pueden adoptar las partículas de CPsV y de otros ophiovirus.

El virión está formado por tres partículas, de genoma segmentado en tres RNAs de simple cadena de polaridad negativa (Figura 6), aunque también se han encontrado partículas virales que encapsidan RNA de cadena positiva en mucha menor proporción, como ocurre con otros virus negativos de plantas (Kormelink et al. 2011) y ningún RNA subgenómico de identidad confirmada hasta el momento.



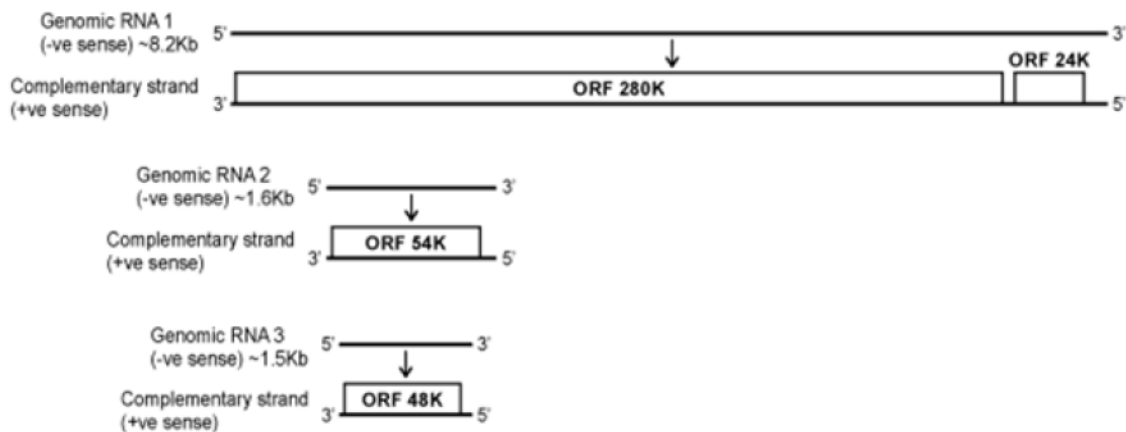


Figura 6. Organización genómica de CPsV

El RNA1 posee un tamaño de 8184 nt (Naum-Ongania et al. 2003). En el extremo 5' se encuentra el gen que codifica para una pequeña proteína de función desconocida (24K). Separado por una región intergénica de 109 nt, se encuentra un segundo gen que codifica para la polimerasa viral, de 280K (Naum-Ongania et al. 2003).

El RNA 2, de 1644 nt contiene el gen de la proteína 54K), cuya función se ha determinado necesaria para el movimiento del virus célula a célula (Robles Luna et al. 2013).

El RNA 3, de 1447 nt se encuentra el gen de la proteína 48K, la proteína de cubierta (CP) (Sánchez de la Torre et al. 1998), siendo la proteína viral más abundante, y por tal razón fue utilizada para el desarrollo de métodos de detección de CPsV serológicos y moleculares que se detallan en el apartado de diagnóstico, y en el capítulo 5 de esta tesis.

Recientemente se determinó que la CP interactúa con la proteína de movimiento (Robles Luna et al. 2013), y para avanzar en el conocimiento sobre el ciclo de replicación de estos virus, se estudió la localización subcelular de la CP, determinándose su localización citoplasmática (Pena et al. 2012).

## 5. Rango de hospedantes y sintomatología

CPsV tiene al género *Citrus* como hospedante natural, incluyendo aquellas especies parientes, que son los trifoliados como *Poncirus trifoliata*, y sus híbridos con *Citrus sinensis* L. Osb. (naranja dulce), como *Citrangue Troyer* y *Citrangue Carrizo*, utilizados como patrones en muchas regiones cítricas del mundo. Los hospedantes comerciales más susceptibles son: *Citrus sinensis* L. Osb. (naranja dulce), *Citrus jambhiri* Lush (limón rugoso), *Citrus reticulata* Blanco (mandarino) y *Citrus paradisi* (pomelo). Otras especies como *Citrus aurantium* L. (naranja agrio), *Citrus limon* Burn. F. (limón), y *Citrus grandis* (L.) Osb. (toronjas), pueden albergar CPsV, pero muestran síntomas menos intensos. Este virus también puede transmitirse a especies herbáceas experimentales como

*Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana* y *Gomphrena globosa*, que serán comentados más adelante.

La psorosis es una enfermedad asociada con síntomas de descamaciones en tronco y ramas jóvenes, principalmente en naranjo dulce y pomelo (figura 7).

Los limoneros y los naranjos amargos son susceptibles a la infección pero no muestran descamación y las mandarinas satsumas y clementinas solo ocasionalmente muestran este síntoma. En general, por debajo de la descamación se produce la formación de goma, que impregna la madera y llega a obstruir los vasos con la consecuente disminución de la conducción de agua, lo que causa decaimiento progresivo y a veces la muerte de las ramas afectadas. Esta acumulación de goma, con el tiempo, se vuelve parda y mancha la madera que puede observarse en cortes transversales de las zonas descamadas del tronco. Estos síntomas han sido usados para el diagnóstico de psorosis en el campo (Alioto et al. 2007).



Figura 7. Descamado del tronco de un árbol a campo. Fotografía tomada en la EEA INTA Concordia.

En el campo, además del descamado, otro síntoma particular es la presencia de flecos cloróticos y anillos en hojas jóvenes, principalmente en las primeras brotaciones de primavera, los cuales aparecen como espacios aclarados entre las venas laterales de las hojas (Wallace, 1957). Estos síntomas pueden generarse en toda la hoja o solo afectar alguna parte de ella y suelen desaparecer a medida que la hoja madura. En el caso de los árboles afectados por PsB generalmente presentan manchas amarillentas en el haz de las hojas envejece, las cuales se corresponden con pequeños depósitos de goma parda en el envés (Alioto et al. 2007).



Los aislamientos de psorosis denominados inicialmente *ringspot* muestran síntomas de manchas o anillos cloróticos en las hojas maduras y a veces en frutos. En algunos aislamientos, estos síntomas se presentan asociados a una descamación virulenta del tronco, pero en el caso del aislamiento CPV4 (Texas, USA) (Garnsey y Timmer 1980) , sólo presenta síntomas foliares, y su comportamiento se considera como el de PsA.

Los síntomas foliares son también manifestados experimentalmente, inoculando por injerto plantas de semilla mantenidas en el invernáculo a 18-24 °C. Las plantas indicadoras de naranjo dulce de las variedades Pineapple, Oliveland o Madam Vinous son los indicadores biológicos comúnmente usados para el indexing de PsA (Roistacher 1993) aunque también podrían utilizarse otras especies como mandarina Temple (*C. reticulata* Blanco) y limón Rugoso (*C. jambhiri* Lush.) (García et al. 1991b). En este ensayo, muchos aislamientos causan una reacción de shock, es decir una necrosis del brote en la primera brotación, seguida de flecos cloróticos (*flecking*), manchas y anillado foliar en las sucesivas brotaciones, pero sin repetir la reacción de *shock*. Existe gran variación en la intensidad de los síntomas de psorosis según las variedades afectadas, los aislamientos de virus presentes y la época del año.

El aislamiento argentino CPsV 90-1-1 de PsA, utilizado en esta tesis, presenta típicamente *shock*, *flecking* y manchas cloróticas en plantas indicadoras de invernáculo (figura 8).

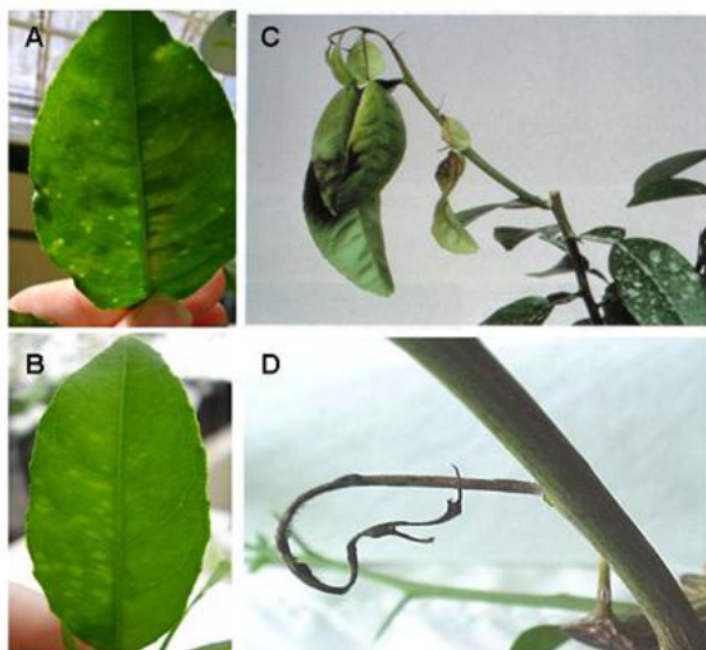


Figura 8. Sintomatología típica de psorosis en plantines de invernáculo infectadas con el aislamiento CPsV-90-1-1. A y B. Presencia de flecos cloróticos (*flecking*) y manchas en hojas jóvenes de psorosis. C y D. Reacción de *shock* de una planta indicadora de naranjo dulce Pineapple (tomadas de Reyes 2009).

La psorosis puede ser transmitida mecánicamente a plantas herbáceas. En *Chenopodium quinoa* y *Gomphrena globosa* causa lesiones locales cloróticas que

posteriormente se vuelven necróticas. En *G. globosa*, además se desarrolla una infección sistémica que se manifiesta con lesiones locales en hojas superiores iguales a las lesiones producidas en las hojas inoculadas.

Garnsey y Timmer (1980) pudieron transmitir mecánicamente el aislamiento CPV4 a *C. quinoa*. Después de 3 pasajes, a partir de una única lesión de *C. quinoa* lograron infectar *G. globosa* y de ésta a cidro, el cual mostró los síntomas característicos del aislamiento de *ringspot*. Así es como se logró contar con un aislamiento del virus, que denominaron CRSV y luego CPV4 (Garnsey and Timmer 1988) que fuera utilizado posteriormente para la secuenciación del genoma (García 2012).

## 6. Control de la enfermedad

En el NEA se aplica el programa PROCITRUS ya mencionado, que utiliza técnicas por las que se obtienen plantas madres de variedades cítricas de alto valor comercial libres de virus. Pero, debido a que la enfermedad probablemente se difunda naturalmente en esta región, las plantas que en el momento de su plantación eran libres de virus, pueden aparecer infectadas con el patógeno y desarrollar la enfermedad, lo que dificulta su control. Además, como se ya mencionó, han aparecido casos de psorosis en el NOA (Zanek et al. 2006).

En la búsqueda de estrategias para el control de la enfermedad se podría, además de la utilización de plantas libres de virus obtenidas mediante la utilización de técnicas de micro injerto, idear estrategias basadas en el control del vector, las cuales diferirían dependiendo de que se trate de un vector alado o de suelo. Pero, como se ha mencionando, hasta el momento no existen evidencias experimentales sobre la naturaleza del vector, y por lo tanto no se ha avanzado en este aspecto.

Por otro lado, si bien en el caso de los trifoliados los síntomas de psorosis son más tenues, no se conocen variedades naturalmente resistentes a psorosis, con lo cual tampoco se cuenta con un germoplasma que sirve de fuente para crear resistencia. Además, esta alternativa debería llevarse a cabo mediante ingeniería genética, ya que el mejoramiento clásico en los cítricos es muy largo y conduce generalmente a cambios en las características agronómicas de la variedad.

En los años 90 se desarrollaron herramientas biotecnológicas para el control de enfermedades en cítricos, mediante la transformación genética y la regeneración de plantas (Peña et al. 1995). Mediante esta tecnología, se aplicaron varias estrategias se detallarán más adelante.

## VII- Detección de CPsV y diagnóstico de Psorosis

La detección del virus y el diagnóstico de enfermedades de plantas, y en particular psorosis poseen una larga historia, y son temas que siguen siendo estudiados en varios grupos de investigación del mundo, y también en este trabajo de tesis.

El primer método diagnóstico desarrollado y aplicado aún hoy fue el ensayo biológico (Roistacher 1991). Consiste en observar los síntomas foliares característicos de psorosis mediante transmisión por injerto del material a evaluar a una planta cítrica sana indicadora, generalmente naranjo dulce. Las plantas indicadoras se inoculan por injerto con dos trozos de corteza de la planta a diagnosticar, se podan para forzar la brotación y se incuban en invernaderos a 18-26° C. Como control, se incluyen plantas inoculadas a partir de un aislado bien caracterizado de CPsV. A las 3-4 semanas, en la primera brotación, aparecen los primeros síntomas que en algunos aislamientos virales, pueden consistir en una reacción de shock en los nuevos brotes que hace que estos se curven, y terminen necrosándose. En otros aislamientos en la primera brotación sólo aparecen flecos y manchas cloróticas, como ocurre con CPV4. En las brotaciones siguientes normalmente no se induce la reacción de shock, y los síntomas foliares de las hojas jóvenes van desapareciendo conforme maduran en adultas (Roistacher 1993; Navas-Castillo y Moreno 1993; Guerri 1999). Las especies cítricas usadas como indicadoras para el diagnóstico de PsA son el naranjo dulce (variedades Pineapple, Oliveland o Madam Vinous) (Roistacher 1993) aunque también podrían utilizarse otras especies como mandarino Temple (*C. reticulata* Blanco) y limón Rugoso (García et al. 1991b).

En el ensayo biológico, la temperatura es fundamental para la expresión de los síntomas. Las temperaturas frías favorecen la manifestación de síntomas foliares en los brotes jóvenes mientras que las altas temperaturas pueden disminuir la intensidad de los síntomas en las hojas e incluso desaparecer (Roistacher 1993; Roistacher et al. 2000). Actualmente se ha desarrollado un trabajo que explica la relación entre la infección de CPsV y la temperatura, señalando como responsable de esta observación al sistema de defensa de la planta mediado por silenciamiento génico, explicado en el apartado siguiente (Velázquez et al. 2010).

Como complemento y confirmación de la enfermedad, Roistacher aconseja se confirme con un segundo del ensayo biológico de protección cruzada. Este se fundamenta en el hecho de que las plantas previamente infectadas con PsA, resisten a la infección con PsB (el tipo más virulento). Este ensayo consiste en re-inocular las plantas que previamente mostraron los síntomas foliares de PsA con dos trozos de corteza provenientes de una fuente de PsB. Como control se incluyen plantas sin sobre-inocular y plantas inoculadas sólo con PsB. Solo las plantas sanas y las pre-inoculadas con un virus distinto a CPsV, a los 2-6 meses de la inoculación con PsB muestran pústulas en los nuevos brotes y manchas foliares características de PsB. Aquellas que no evidenciaron la infección característica de PsB se confirma que el material a evaluar estaba infectado con el tipo de PsA (Levy and Gumpf 1991; Roistacher 1993; Guerri 1999; Roistacher et al. 2000).

El ensayo biológico sobre plantas indicadoras y el ensayo de protección cruzada requieren de habilidad de las técnicas de injerto, y del reconocimiento de los síntomas, siendo además, procedimientos de diagnóstico lentos y muy costosos. A medida que se avanzó en la caracterización del agente causal de psorosis, se fueron desarrollando herramientas alternativas para el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, hasta nuestros días sigue siendo el único método de diagnóstico validado y aceptado en Argentina.



Se han desarrollado diferentes métodos inmunológicos aplicados para CPsV en búsqueda de un procedimiento rápido de detección de psorosis. García et al. (1997) desarrollaron un ELISA doble sándwich (DAS-ELISA) para la detección de CPsV. Posteriormente, Alioto (1999), mejoró la detección mediante el desarrollo del ELISA triple sándwich (TAS-ELISA) y en 2006 en nuestro grupo de trabajo se realizaron modificaciones a la técnica (TAS-ELISA-HRP), haciéndola más rápida y sensible (Zanek et al. 2006).

Por otro lado, se avanzó en métodos moleculares de detección de CPsV basados en sus ácidos nucleicos. Se diseñaron varios cebadores para la detección de CPsV mediante RT-PCR como un método alternativo para el diagnóstico (García et al. 1997; (Barthe et al. 1998) (Legarreta et al. 2000). Actualmente, el TAS-ELISA y la RT-PCR son los métodos más rápidos y confiables para la detección del virus en árboles de campo (Martín et al. 2002).

Recientemente, se ha aplicado la PCR cuantitativa (qPCR), ampliamente utilizada para el diagnóstico de muchos agentes patógenos en diversos cultivos, incluyendo las plantas leñosas como los cítricos y otras especies frutales. En varios trabajos han demostrado la fiabilidad de esta herramienta, incluso para la detección simultánea de varios virus en cítricos (Loconsole et al. 2010; Lin et al. 2013; (Saponari et al. 2013).

En el capítulo 5 de esta tesis, se desarrollará el avance de esta técnica para la detección de CPsV en Argentina, y sus alcances.

## **VIII- Plantas resistentes a Virus**

Aprovechando el hecho de que los virus poseen pequeños genomas, conteniendo unos pocos genes cuyas funciones en el ciclo viral en su mayoría ya se encuentran dilucidadas, estos patógenos son blancos apropiados para la aplicación de estrategias basadas en los principios de resistencia derivada del patógeno (*pathogen-derived resistance*; PDR) obtenidas por manipulación genética. Este concepto fue acuñado por primera vez por Sanford and Johnson (1985) y se propuso como una alternativa de amplia aplicación para la generación de resistencia. El ejemplo más difundido basado en PDR ha sido la expresión genes de proteína de cápside viral aunque también fueron exitosas las estrategias basadas en la expresión de proteínas mutantes derivadas de otros genes virales como los de la proteína de movimiento o replicasas (Prins et al. 2008).

En muchos de los estudios de PDR se observó que la expresión de RNAs virales no codificantes también llevaban a la inducción de resistencia en plantas transgénicas (de Haan et al. 1992); (Lindbo and Dougherty 1992). Estos resultados llevaron al descubrimiento de un nuevo mecanismo de resistencia innata de las plantas; el denominado silenciamiento génico, explicado a continuación.

## **IX- Silenciamiento génico**

El primer gran hito histórico de la biología, que motivó investigaciones que elucidaran luego el mecanismo de silenciamiento génico, ocurrió con plantas de petunia (*Petunia hybrida*). Éstas fueron transformadas con el gen de la chalcona sintasa (CHS), presente naturalmente en esta especie y responsable de la pigmentación violácea de sus flores. Estas plantas estaban modificadas de manera de sobre-expresar CHS con el objetivo de intensificar el color púrpura de las flores. Sin embargo sorpresivamente las flores obtenidas de la progenie presentaron un amplio rango de patrones de pigmentación que iban desde el púrpura intenso a patrones de púrpura y blanco hasta flores que eran completamente blancas. El análisis molecular de esta población de plantas transgénicas reveló que en algunas líneas ambas formas del gen; el endógeno y el introducido, habían sido “apagadas” o “silenciadas” dando origen a un fenómeno que en aquel entonces los autores denominaron “co-supresión” (Napoli et al. 1990); (van der Krol et al. 1990).

Más tarde se descubrió que la introducción de ácidos nucleicos extraños en las células vegetales, así fueran derivados de virus o transgenes, resultaba en la producción de RNA de doble hebra que posteriormente se procesaban dando especies de RNAs pequeños que al final serían los que mediarían la especificidad observada en el mecanismo. Estas especies de sRNAs se conocen actualmente como RNAs pequeños de interferencia (*small interfering RNAs*: siRNAs) (Baulcombe 2004; Meister and Tuschl 2004).

Luego de varios años de avance en el conocimiento científico del silenciamiento génico, hoy se sabe que es un mecanismo paneucariótico de regulación génica con implicancia fundamental en muchos procesos biológicos, y se tiene un profundo detalle de las especies moleculares intervinientes y su biogénesis, aunque la elucidación total del mecanismo aún no ha sido completada (Tretter et al. 2008); Bologna and Voinnet 2014). En plantas, el silenciamiento actúa no sólo a nivel de RNA sino también de DNA (Incarbone and Dunoyer 2013). Los mecanismos de silenciamiento a nivel de RNA incluyen escisión de mRNA o represión traduccional, mientras que a nivel de DNA involucra metilación del DNA e histonas, impidiendo el acceso al DNA por parte de la maquinaria transcripcional, conduciendo así al silenciamiento génico transcripcional (TGS) (Law and Jacobsen 2010).

Los hallazgos en silenciamiento, que fueron en sus comienzos exclusivos del reino vegetal fueron de a poco encontrando sus análogos en otras especies eucariotas como nemátodos, principalmente *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998; Ding et al. 2004); insectos como *Drosophila melanogaster* (Kennerdell and Carthew 1998; Lu et al. 2005) protozoarios, e incluso recientemente se reportaron sistemas de silenciamiento en procariotas (Wiedenheft et al 2012).

Todas las manifestaciones de silenciamiento de RNA se basan en la acción de moléculas de siRNA de 21-24 nt que se originan a partir del procesamiento de dsRNA por parte de enzimas ribonucleasas *Dicer-like* (DCLs), que poseen dominios de tipo RNAsaIII, con participación de proteínas de unión a dsRNA (*dsRNA binding proteins*, DRBs). Luego de este procesamiento, una hebra del sRNA duplex se une a una proteína Argonauta (AGO), que es parte constitutiva de un complejo multienzimático denominado en inglés *RNA-induced silencing complex* (RISC) y que guiará la inactivación específica de secuencia de su RNA diana (Incarbone and Dunoyer 2013). Participan también en la



generación de siRNA secundarios RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs). Los componentes mencionados participan tanto en las rutas de silenciamiento de RNA de plantas involucradas en la biogénesis de RNA como en rutas efectoras (Garcia-Ruiz et al. 2010).

Se han descrito cuatro DCLs en *Arabidopsis thaliana* que catalizan la escisión del duplex de RNA generando RNA pequeños de 21-24 nt a partir de distintas clases de precursores dsRNA (Brodersen and Voinnet 2006); (Chapman and Carrington 2007); y 10 proteínas AGO (Mallory and Vaucheret 2010).

Las DCL generan dos clases de RNAs pequeños: siRNA y microRNAs endógenos (miRNA) (Henderson et al. 2006; Q. Liu et al. 2009). Los primeros provenientes del corte de dsRNA largo con un nivel perfecto o caso perfecto de homología; mientras que los segundos son especies discretas provenientes de la escisión de precursores de RNA plegados con imperfecto nivel de homología y se puede acumular individualmente a niveles extremadamente altos dentro de los tejidos vegetales. Todos los dúplex siRNA y miRNA conocidos son protegidos de la degradación por 2'-O-metilación, mediada por la metil-transferasa *HUA ENHANCER 1* (HEN1) (Boutet et al. 2003; Yu et al 2005). DCL1 está involucrada mayormente en la generación de miRNAs, mientras que los siRNA son producidos por DCL 2, 3 y 4 generando siRNA de 22, 24 y 21 nt respectivamente (Blevins et al, 2006)

En cuanto a las 10 proteínas AGO descritas en *Arabidopsis*, puede decirse que su agrupamiento filogenético se da en tres *clusters*: AGO 1/AGO 5/AGO 10; AGO 2/ AGO 3/ AGO 7; y AGO 4/ AGO 6/ AGO 8/ AGO 9, aunque sus funciones no necesariamente coinciden con esta clasificación (Mallory and Vaucheret 2010). Se sabe que AGO1 participa en la acción de los miRNAs y de los siRNA producidos por la DCL4. AGO 2 está involucrada en el silenciamiento antiviral; mientras que las AGO4, AGO6 y AGO9 participan en la metilación de citosinas en el DNA en regiones de homología con los siRNAs de 24nt, modificando la cromatina, contribuyendo a la estabilización del genoma en regiones donde hay transposones o secuencias repetitivas (Law and Jacobsen 2010).

La figura 9 esquematiza el mecanismo molecular de silenciamiento génico post-transcripcional (Bologna and Voinnet 2014).

Los miRNAs son RNAs pequeños de 20-40 nt, codificados en el genoma de la planta, estos se transcriben por la RNA polimerasa II y son procesados en el núcleo. Su función es regular la expresión de genes principalmente del desarrollo. Esta regulación puede ocurrir arrestando la traducción o por clivado del mRNA blanco. En cuerpos asociados al nucléolo denominados D-bodies, los precursores de miRNAs son procesados por DCL1 y otras proteínas (Fang and Spector 2007; Fujioka et al. 2007)

Los miRNA procesados son exportados del núcleo al citoplasma para ejercer allí su función. Al menos en mamíferos, los miRNA actúan en agregados citoplasmáticos denominados *Processing-bodies* (P-bodies) (Sen and Blau 2005; Pillai et al. 2005; J. Liu et al. 2005; Jakymiw et al. 2005).



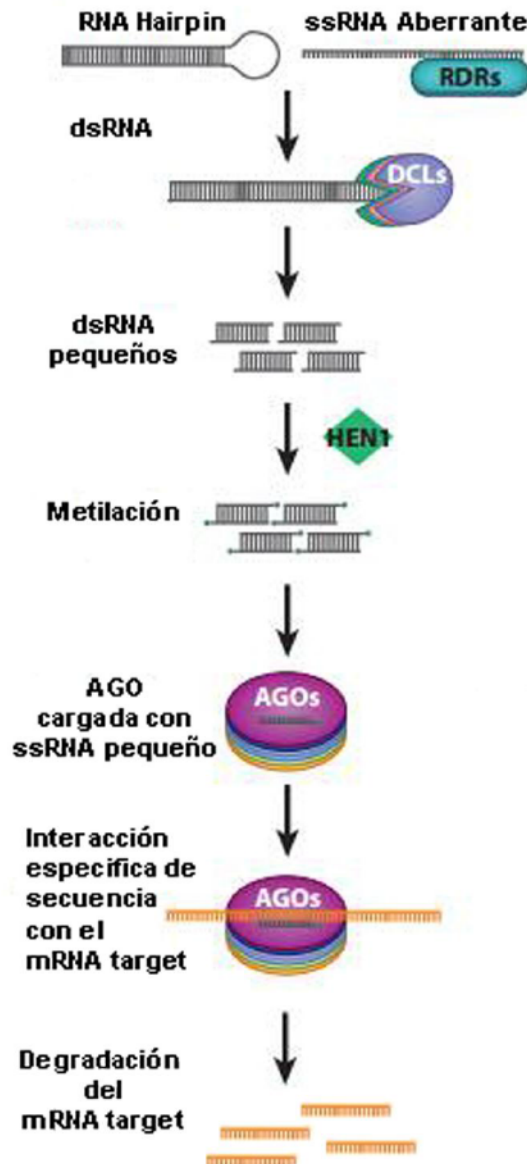


Figura 9. Mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. Las moléculas inductoras del silenciamiento pueden ser RNAs con estructuras de tipo *hairpin* o RNA de simple cadena (ssRNA) aberrantes que son convertidos a RNA doble hebra (dsRNA) por las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs). Las proteínas de tipo DICER (DCLs) procesan el dsRNA a moléculas más pequeñas (dsRNA pequeños), protegidas de la degradación, gracias a la metilación a cargo de la proteína HEN1. Una proteína AGO carga una de las hebras (ssRNA pequeño) y esta secuencia dirige la degradación de las moléculas blanco (mRNA *target*). Tomada de Bologna and Voinnet 2014.

En plantas se ha encontrado que además de encontrarse en el núcleo, AGO1 se encuentra libre en el citoplasma, asociada a la membrana externa del retículo endoplásmico (RE) y co-localiza con marcadores de P-bodies (Bologna and Voinnet 2014). Hasta el momento se ha encontrado que la función asociada al complejo de arresto de la traducción ocurre en la membrana externa del RE mientras se desconoce si AGO1 cliva los mRNAs en P-bodies o libre en el citoplasma (Rogers and Chen 2013;

Pomeranz et al. 2010; Zhang et al. 2006) (Brodersen et al. 2008; Voinnet 2009; Xu et al. 2006).

## **X- Defensa antiviral mediada por silenciamiento**

Además de su rol en la regulación de los procesos vinculados al desarrollo de la planta y el mantenimiento de la integridad genómica, el silenciamiento constituye un sistema de inmunidad primaria frente a virus (Incarbone and Dunoyer 2013; (Schuck et al. 2013); Pumplin and Voinnet 2013), e incluso se ha descubierto que el silenciamiento puede aplicarse a patógenos no virales, mediante la inducción o represión de miRNAs específicos durante la infección con algunos hongos u otros patógenos, que contribuyen a la defensa de la planta (Katiyar-Agarwal and Jin 2010; Navarro et al. 2006).

### **1. Recovery y VIGS**

Tempranamente se descubrió el fenómeno denominado *recovery*, en el que las plantas infectadas con virus se recuperan de dicha infección. Luego se estudió el proceso denominado silenciamiento génico inducido por virus (*virus-induced gene silencing*, VIGS), describiendo tanto aquellos casos en que existe homología con la secuencia del virus, como de algún transgén o gen endógeno de la planta hospedadora (Lindbo et al. 1993; Kumagai et al. 1995). El mejor sistema utilizado para el estudio del VIGS ha sido hasta el momento el de la fitoeno desaturasa vegetal (PDS) y el vector viral PVX-PDS en plantas de *N. bethamiana*. Con este sistema y el de PVX-GFP y la proteína exógena GFP, se determinó que la iniciación del VIGS es dependiente de la infección viral e independiente del gen nuclear, aunque el mantenimiento del silenciamiento a lo largo del tiempo ya no depende del virus, sino del gen nuclear, ya que en ambos casos (PDS y GFP) el mRNA fue degradado por el mismo mecanismo, pero produjo fenotipos diferentes (Ruiz et al. 1998). Este fenómeno ha sido desarrollado y confirmado en muchos virus de plantas (Li and Ding 2006). Con los dos procesos estudiados (el *recovery* y el VIGS) se llegó a la conclusión de que se trata de procesos diferentes, que aunque comparten la maquinaria de silenciamiento, difieren en que en el primero el target del silenciamiento es el RNA viral, y en el segundo la diana son RNA endógenos de la planta, disparados por la infección viral (Ding and Voinnet 2009).

### **2- El mecanismo molecular de silenciamiento aplicado a defensa antiviral**

La mayoría de los virus vegetales tiene su genoma a RNA (Hull 2002). El RNA viral actúa como mRNA pero también como molde para replicación en el citoplasma de la célula hospedante (Ortin and Parra 2006). El silenciamiento antiviral es disparado por dsRNAs provenientes de intermediarios de replicación o estructuras intramoleculares plegadas dentro de los genomas virales (Donaire et al. 2009). En el curso de la infección viral, los siRNAs son generados y acumulados en la planta y podrían ocasionar una

reducción del título viral, logrando una inmunidad local y sistémica (Csorba et al. 2009; Pantaleo 2011).

Los dsRNA virales son procesados fundamentalmente por DCL 4 o su sustituto DCL 2 produciendo siRNAs de 21 y 22 nt respectivamente (*virus-derived small RNAs*, vsiRNAs) (Blevins et al. 2006) Deleris et al. 2006). La óptima producción de vsiRNAs requiere también la acción de proteínas de unión a dsRNA (*dsRNA binding proteins*, DRBs) tal como DRB 4, que facilita la síntesis de vsiRNAs dependientes de DCL 4 a partir de virus a RNA y DNA (Qu et al. 2008). Los vsiRNA son luego reclutados principalmente por las proteínas AGO 1 y AGO 2 para direccionar el complejo RISC. Allí una de las hebras del siRNA es removida y la otra es usada para dirigir al complejo efector hacia su molde de RNA viral, que es inactivado por clivaje endonucleolítico en el medio del dúplex siRNA-RNA diana (Incarbone and Dunoyer 2013; Schuck et al. 2013). También se ha indicado que AGO 5 y AGO 7 contribuyen a la protección contra virus (Azevedo et al. 2010; Takeda et al. 2008).

En el caso de plantas infectadas con virus a DNA como geminivirus y pararetrovirus, se producen grandes cantidades de vsiRNAs de 24 nt dependientes de DCL 3. Estas especies dirigen la metilación de citosina y la condensación de cromatina en un proceso denominado metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) (Raja et al. 2008; (Rodríguez-Negrete et al. 2009; Yadav and Chattopadhyay 2011).

Retomando la comparación entre el *recovery* y el VIGS, recientemente se identificaron diferentes roles y distintos modos del procesamiento del RNA en estos dos procesos, utilizando la batería de mutantes de *Arabidopsis* carentes de expresión de las distintas proteínas implicadas en el silenciamiento mediado por RNA, infectadas con el virus *Tobacco rattle virus* (TRV) fusionado a GFP y PDS para analizar el *recovery* y el VIGS respectivamente (Ma et al. 2014). Los resultados demuestran que AGO2 y AGO4 están involucradas en la susceptibilidad a TRV, mientras que en el VIGS, el silenciamiento de genes endógenos parecería estar mediado en gran parte por AGO1. Sin embargo, el *recovery* parecía estar mediado por diferentes componentes, ya que todos los mutantes antes mencionados fueron capaces de recuperarse de la inoculación con TRV-GFP, y sugirieron que en este proceso está implicada la represión de la traducción de transcriptos virales, encontrando también que la recuperación viral induce un aumento en la formación de P-Bodies lo que indica una importante papel de éstos en la eliminación del RNA viral.

Con el fin de evitar la replicación y el movimiento viral, las plantas han desarrollado maneras de amplificar la respuesta antiviral mediante silenciamiento (Wang et al. 2009). Esto sucede mediante la producción de vsiRNAs secundarios. Mientras los vsiRNAs se forman directamente a partir de los intermediarios de replicación del virus, los secundarios se generan por la acción de las RDRs que convierten RNA simple hebra en nuevo dsRNA, que será sustrato de las DCLs (Incarbone and Dunoyer 2013). En *A. thaliana* RDR 1, RDR 6 y en menor medida RDR 2 están implicadas en este paso de amplificación (Qu 2010).

El silenciamiento antiviral también puede disiparse desde su sitio de iniciación hacia tejidos circundantes, y en éste escenario, se considera que la señal de silenciamiento a larga distancia son los siRNA, discusión que será abordada en este trabajo de tesis.



### 3. Proteínas virales supresoras del silenciamiento antiviral

Como en todos los mecanismos de patogénesis, los virus han evolucionado desarrollando formas de evadir a esta defensa de la planta, disminuyendo o anulando el silenciamiento (Ding and Voinnet 2007; Burgyn 2008). Como parte de la estrategia de contra-ataque los virus poseen proteínas que cumplen la función de supresión del silenciamiento de RNA, denominadas supresoras, o en inglés, *viral suppressors of RNA silencing* (VSRs). Las VSRs son altamente diversas en secuencia, estructura y actividad entre las distintas familias de virus, lo que supone un fenómeno de convergencia evolutiva (Incarbone and Dunoyer 2013; Pumplin and Voinnet 2013). Por otro lado, las VSRs suelen ser proteínas multifuncionales, que además de tener actividad supresora del silenciamiento, presentan funciones esenciales en el ciclo de vida del virus (replicación, encapsidación o movimiento), como también elicitores de la inducción del mecanismo de defensa de la planta (Vuorinen et al 2011; Incarbone and Dunoyer 2013).

Hasta hace poco tiempo los mecanismos de acción de las VSRs se dividían en tres tipos: 1) unión al dsRNA impidiendo su procesamiento por las DCLs, 2) unión y secuestro de siRNAs, evitando así su ensamblado en el complejo RISC, y 3) interfiriendo directamente en alguno de los componentes enzimáticos del complejo RISC. Hoy se sabe que la supresión es en realidad un mecanismo más complejo (Incarbone and Dunoyer 2013).

Dentro de las proteínas supresoras estudiadas con más detalle se destacan HC-Pro que es codificada por los potyvirus, P19 codificada por los tombusvirus, P21 de *Beet yellow virus* y 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV). El caso de la P19, se sabe que une específicamente siRNA de 21 nt, impidiendo su incorporación al complejo RISC (Lakatos et al. 2004), e inhibiendo también el movimiento por vasculatura de los vsRNAs responsables del silenciamiento a células vecinas y a larga distancia (Havelda et al. 2003). Estas propiedades también fueron encontradas en otras VSRs como P21 y HC-Pro (Chapman et al. 2004; Lakatos et al. 2006). Además, otros mecanismos han sido descritos como el hallado para P19, que media la inducción del miR168 inhibiendo la acumulación de AGO1 (Varallyay et al. 2010), o como efector de la inducción de proteínas de resistencia (PR) (Sansregret et al., 2013).

Analizando el caso de la proteína 2b de CMV, tempranamente se determinó que ésta era capaz de bloquear la diseminación de la señal sistémica (Guo and Ding 2002). Luego, cuando esta proteína era expresada en plantas de *A. thaliana*, producía fenotipos anormales semejantes a los mutantes que no expresan AGO1, en concordancia con la observación de que AGO1 es blanco de la proteína 2b, lo que condujo a proponer una interacción directa entre 2b y AGO1 (Zhang et al. 2006). Posteriormente se encontró que 2b bloquea el PTGS indirectamente, esto es, interfiriendo en la respuesta de defensa mediada por ácido salicílico, que induce una RdRp de la célula hospedante, involucrada en la síntesis de siRNAs (Diaz-Pendon et al. 2007). Por último se estudió la actividad 2b *in vivo* y se encontró que la unión de siRNAs por parte de 2b está directamente relacionada con la supresión del silenciamiento, mientras que la interacción con AGO1 no es esencial (González et al. 2012; Duan et al. 2012). Esto muestra que el estudio de los mecanismos de supresión están poco explorados, por un lado; y que la unión a siRNAs es uno de los mecanismos más usados por las VSRs (Sansregret et al. 2013).

Se han encontrado virus que presentan la función supresora en más de una proteína, como es el caso de Citrus tristeza virus (CTV), particularmente interesante en esta tesis por tratarse de un virus de cítricos, el cual codifica para tres supresoras que actúan evitando la diseminación de la señal de silenciamiento (p20 y p25), e impidiendo el establecimiento del silenciamiento intracelular (p20 y p23) (R. Lu et al. 2004). Incluso se ha obtenido resistencia frente a CTV mediante cítricos transgénicos que expresan versiones no traducidas de estas tres proteínas supresoras (Soler et al. 2012). En el caso de la proteína p23, se ha profundizado su estudio y se encontraron diversas funciones además de la supresión intracelular del silenciamiento, como la regulación de la acumulación asimétrica de las hebras de RNA de CTV, la inducción del síndrome del plantín amarillo en naranjo amargo y pomelo, y otras funciones que sugieren que p23 es una proteína multifuncional, clave en la interacción virus-hospedante (Flores et al. 2013).

Numerosos estudios de la inmunidad de plantas contra patógenos no virales han revelado la existencia de una sofisticada red de señalización y rutas efectoras que confieren inmunidad basal, activada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) (Zipfel et al. 2004). Esta barrera de defensa basal es llamada inmunidad disparada por PAMP (*PAMP-triggered immunity*, PTI) (Shan et al. 2008). Los patógenos co-evolucionaron de manera de sortear estas barreras, produciendo factores de virulencia, llamados efectores. A su turno, las plantas desarrollaron mecanismos más específicos de inmunidad disparada por estos efectores (*effector-triggered immunity*, ETI) en los que PR de la planta reconocen específicamente a estos efectores, y mediante una cadena de transducción de señales que involucra la vía del ácido salicílico, etileno y óxido nítrico, desatan respuesta hipersensible (HR) que involucra reacciones de necrosis localizada y muerte celular programada (Sansregret et al. 2013; Pumplin and Voinnet 2013).

Este mecanismo mediado por PTI y ETI, por estar basado en proteínas, históricamente fue separado de los mecanismos de defensa mediados por silenciamiento (basado en DNA y RNA). Sin embargo estudios recientes asemejan el PTGS y TGS al sistema de señalización de PTI y ETI (Pumplin and Voinnet 2013). Así, la barrera primaria de defensa de la planta sería la del silenciamiento antiviral, ya sea por PTGS o TGS; la “contra-defensa” viral estaría mediada por las VSRs, vías que involucran autofagia (Derrien et al. 2012) y otros mecanismos de evasión del TGS (Pooggin 2013); y la “contra contra-defensa” de la planta sería por ejemplo la activación de otras AGO en caso de que las AGO normalmente intervinientes en el complejo RISC estén comprometidas por la acción supresora viral (Voinnet et al. 1999; Schott et al. 2012).

## **XI- Movimiento de los virus célula a célula y a larga distancia**

Las plantas superiores han evolucionado en el desarrollo de tejido vascular para la conducción de agua y nutrientes a través de la planta. Gracias a ello las plantas se organizan en órganos especializados: las raíces absorbiendo agua y minerales, y las hojas produciendo fotosintéticamente fuentes de carbono metabólicamente utilizables.



El tejido vascular está compuesto por el xilema, que transporta mayormente agua, y considerado libre de RNA (Buhtz et al. 2008), y el floema, que hace lo propio con compuestos orgánicos e inorgánicos (Fisher 2000). Además, mediante los plasmodesmos (PDs), que proveen continuidad citoplasmática y de retículo endoplásmico entre células adyacentes, ocurre el transporte célula a célula de moléculas. Los virus de plantas explotaron estos sistemas de transporte de la planta, para lograr la diseminación de la infección y la invasión de tejidos y órganos.

La replicación y la expresión de proteínas del virus se inicia en la célula infectada y continua con el transporte de unos pocos genomas virales a la célula vecina pasando a la siguiente, en un proceso lento (de una célula por hora aproximadamente) y el frente de infección avanza solo una distancia corta por día (Cheng et al. 2000; Vuorinen et al. 2011). Las células epiteliales pueden infectarse, por ejemplo mecánicamente, pero luego la infección puede estar bloqueada entre éstas y las del mesófilo, o infectar unas pocas células. En infecciones compatibles, las células del mesófilo pueden llegar a ser la fuente más rica de virus que se detectan en una hoja (Valkonen and Somersalo 1996).

El movimiento del virus célula a célula se realiza generalmente por vía simplástica a través de PDs, usando proteínas de movimiento, codificadas en su genoma, que interaccionan con los PDs. Dependiendo de la especie viral, el movimiento a través de PDs puede ocurrir en forma de virión, o como complejos RNP; y puede requerir de otros factores codificados por los virus (Peleg et al. 2007; Vuorinen et al. 2011; (Mekuria et al. 2008; Niehl and Heinlein 2011; Hipper et al. 2013).

Para que el movimiento sistémico del virus pueda alcanzar diferentes órganos de la planta, es necesario que el virus se mueva célula a célula y alcance el sistema vascular, realizando lo que en inglés se denomina *uploading* (cargado); luego se transporte dentro del mismo; y que tenga una salida de la vasculatura (*unloading*) o descarga, para luego moverse hacia tejidos o células receptoras (Lough and Lucas 2006). Después de invadir las células de la vaina y del parénquima vascular, y de éstas a las células acompañantes (CC, del inglés *companion cells*) llegan a las células crivadas (elementos crivados o SE, *sieve elements* en inglés) ofreciendo la posibilidad de un transporte a larga distancia (Figura 10a, Vuorinen et al. 2011).

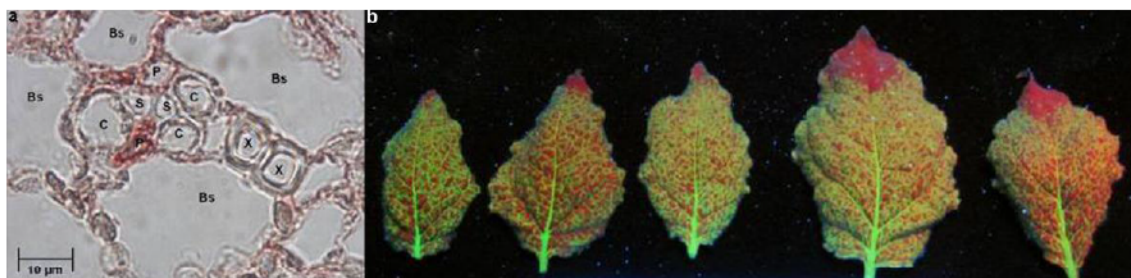


Figura 10. a. Sección de una vena menor de una hoja de papa infectada con el virus A de la papa (PVA), 10 días después de la inoculación. La tinción roja es una inmuno-tinción con anticuerpos anti-PVA que revela las células infectadas por el virus en el tejido vascular: B, células de la vaina; C, célula acompañante (CC); S, elemento criboso (SE); P, células parenquimáticas del floema; X, vaso xilemático. b. Infección sistémica de hojas de *Nicotiana benthamiana* usando el virus PVA fusionado a GFP. Las hojas fueron fotografiadas bajo luz UV a los 14 días post-inoculación.

El color verde (fluorescencia de GFP) indica las células infectadas por el virus, mientras que el color rojo se debe a la auto-fluorescencia de la clorofila. La edad de la hoja y la etapa de desarrollo, aumentan de izquierda a derecha. PVA-GFP no se descarga desde las venas en las puntas de las hojas viejas porque el tejido ha sido objeto de transición fuente-sumidero. Tomada de Vuorinen et al. 2011.

El transporte a larga distancia suele darse desde tejidos fotosintéticos denominados “fuentes” como es el caso de hidratos de carbono que viajan desde las células fotosintéticas del mesófilo, exportándose hacia tejidos que son “sumidero” de estos nutrientes, por vía floemática, y los virus, deberían llevar la misma dirección (Turgeon 1989). Los SE y las CC tienen un mismo origen, pero al diferenciarse los SE pierden las organelas (núcleo, ribosomas y mitocondrias) lo que las hace dependientes de las CC, haciendo que los virus no puedan multiplicarse en los SE. Generalmente, el mayor obstáculo que presentan los virus está localizado entre las células de la vaina y las del parénquima vascular, o entre éstas y las CC. Entre las células del parénquima vascular y las CC existen un bajo número de PDs, y en plantas como *N. tabacum* y *Solanum tuberosum* no existe esa conexión, es decir, las células del parénquima vascular están aisladas del complejo CC-SE, y en esos casos el transporte de macromoléculas y virus debería ocurrir por vía no simplástica, por el apoplasto (Davidson et al. 2011).

Además, existen algunas diferencias entre los distintos virus-hopedores que se han estudiado. En el caso de TMV-*N. benthamiana* el virus es cargado (*uploading*) al floema desde todas las venas o nervaduras, mientras que en el caso de los potyvirus lo hacen sólo desde las venas más pequeñas del tejido fuente. Sin embargo, la descarga (*unloading*) de ambos virus se realiza desde las grandes nervaduras del tejido sumidero (Roberts et al. 1997; Ding et al. 1998; Rajämäki and Valkonen 2002). Es importante tener en cuenta que la punta de la hoja es la parte más vieja y que es la primera zona de la hoja que siendo tejido sumidero se torna a tejido fuente y que una vez iniciado, éste proceso va avanzando hacia la base de la hoja. Es decir, como se muestra en la Figura 10b (Vuorinen et al. 2011), en la punta de la hoja no hay invasión viral, correspondiéndose con su cambio fisiológico de tejido sumidero a tejido fuente y por ende enviando nutrientes, y no recibiendo. A medida que la hoja madura un frente de células que avanza hacia la base de la hoja se va tornando fuente, y así, más hojas que se encuentran en el tope de la planta se irán convirtiendo de sumidero a fuente. Esto muestra que el virus tendrá poco tiempo para transportarse desde el sitio de infección que sea tejido fuente, hasta entrar en el floema para invadir otros tejidos que serán sumidero. En esos tejidos sumidero, el virus se descarga desde las células SE a las CC, y así en sentido reverso cuando ingresa al floema de otro tejido nuevo (sumidero), llegando a las células donde podría replicarse, como el mesófilo. Como los PDs de los tejidos más jóvenes están más dilatados, el tejido sumidero es más permisivo a la infección que el tejido fuente.

Como se mencionó en las SE no habría multiplicación viral y por ende el transporte sistémico sería un proceso pasivo, que se estima ocurriría a una velocidad de unos cm por hora, considerando una infección de pocos días (Cheng et al. 2000; van Bel 2003). También se ha observado con TMV o PVA que el virus podría ir descargándose desde las SE a las CC a lo largo de su viaje a larga distancia, es decir, a células del pecíolo y



del tallo y no sólo en células sumidero o raíz. Los virus que se restringen al floema, se multiplican en las CC y en las células del parénquima floemático. El movimiento entre estas células es facilitado por proteínas virales (MPs) que no hacen lo mismo entre éstas y las células del mesófilo. La acumulación de estos virus en el floema favorece la transmisión por vectores que se alimentan de la sabia floemática y esto justifica la restricción de la multiplicación viral a este tejido (Vuorinen et al. 2011).

La inhibición que presentan algunos virus al movimiento en el floema, puede deberse a inhibición en la entrada al complejo CC-SE de la hoja inoculada, en la salida de éstas a las hojas sumidero, o ambas posibilidades. El virus podría ser destruido o su transporte bloqueado en las células del floema. Existen evidencias que apoyan que el mecanismo de silenciamiento podría ser activo en las células del floema, como es la presencia de proteínas supresoras para la descarga en el tejido sumidero (Wintermantel et al. 1997; Cao et al. 2010), sin embargo, otros resultados contradicen esta hipótesis, como se verá en el siguiente apartado (Melnik et al. 2011).

## **XII- Diseminación del silenciamiento génico**

Se ha demostrado que existe un tráfico especializado de macromoléculas entre células y sistémicamente a través de la planta mediante dos estructuras especializadas desarrolladas en el apartado anterior: los plasmodesmos y el floema. Las macromoléculas transportadas por estas vías son proteínas, hormonas y ácidos nucleicos (Haywood et al. 2005; Lough and Lucas 2006); dentro de éstos últimos, durante muchos años se creyó que el RNA no podía ser transportado por vasculatura, ya que sería degradado por RNAsas, pero luego surgieron numerosas evidencias de lo contrario: se transportan transcritos y otras moléculas de RNA de diverso tamaño que regulan el desarrollo, el metabolismo y la respuesta a estreses bióticos y abióticos (Jorgensen 2002; Harada et al. 2010; (Buhtz et al. 2008; Kehr and Buhtz 2008; K. J. Lu et al. 2012; Pallas and Gomez 2013).

Como ya se dijo, los virus invaden los tejidos y órganos vegetales moviéndose célula a célula a través de plasmodesmos (PDs) y sistémicamente por vía floemática. Dado que el mecanismo antiviral más eficiente es el silenciamiento, resulta indispensable la elucidación del modo en que éste es capaz de moverse entre células y a larga distancia.

### **1. Diseminación del silenciamiento**

La primera evidencia de la diseminación del silenciamiento fue reportada en *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*, mediante el uso de injertos y combinaciones de plantas transgénicas (Palauqui et al. 1997; Voinnet and Baulcombe 1997; Palauqui and Vaucheret 1998). Allí se demostró que el silenciamiento no era un evento autónomo de una célula, sino que era propagado a través del injerto. La señal sistémica no pudo ser detectada directamente, pero dada la dependencia con la homología de secuencia nucleotídica entre el transgén y sus *targets*, era probable que fuera un RNA. Los experimentos con injertos fueron la clave para entender el movimiento del

silenciamiento. Permitieron una clara separación entre la “fuente” productora de la señal y su “sumidero” (Kalantidis 2004; Tournier et al. 2006).

Luego se encontró que podían existir diferentes mecanismos de propagación del silenciamiento operando a distintos niveles (Kalantidis et al. 2008): la iniciación del silenciamiento a nivel autónomo de células, la propagación célula a célula, y la propagación sistémica (Melnyk et al. 2011).

## 2. Propagación del silenciamiento a corta distancia

Teniendo en cuenta la propagación célula a célula (a corta distancia) del silenciamiento, se estima que el silenciamiento se inicia en una célula y se propaga a un grupo de 10-15 células adyacentes en las que la propagación tuvo lugar en ausencia de amplificación de la señal (Kalantidis et al. 2006; Himber et al. 2003). Este transporte es por vía simplástica a través de plasmodesmos (Himber et al. 2003 (Smith and Baulcombe 2007)). Para identificar las proteínas involucradas en el movimiento de las señales del silenciamiento de corta distancia se utilizaron baterías de mutantes de *Arabidopsis* con distintos transgenes inductores de silenciamiento expresados específicamente en células acompañantes del floema bajo el promotor tejido-específico de floema del gen SUC2. Los genes *target* del silenciamiento fueron la fitoeno desaturasa (PDS) o SULPHUR (SUL) que al ser silenciados, arrojan fenotipos de clorosis o fotoblanqueado (Dunoyer et al. 2007; Smith et al. 2007; Dunoyer et al. 2010a; Baurle et al. 2007; Searle et al. 2010; Manzano et al. 2009). Estos estudios condujeron a que la producción de la señal y el movimiento de silenciamiento involucran más de una ruta, y que el movimiento a corta distancia no requeriría amplificación, ya que DRD6 no es requerida. Posteriormente Dunoyer y colaboradores profundizaron este estudio y aplicaron el sistema SUC-SUL expresando DCL4 específicamente en células acompañantes en *Arabidopsis dcl4* mutantes (Dunoyer et al. 2010b), en donde el movimiento del silenciamiento se vió restaurado. Allí se demuestra que DCL4 es requerida en las células que producen la señal de silenciamiento, y como esta DCL produce siRNAs de 21 nt, ésta sería la señal de silenciamiento de corta distancia. La expresión de AGO 1 en células acompañantes en experimentos análogos no restauró el movimiento del silenciamiento en *Arabidopsis ago1* mutantes, indicando que AGO1 actúa en células que reciben la señal de silenciamiento (Dunoyer et al. 2010b). A su vez serían los dúplex de 21nt la señal de silenciamiento, y luego, en las células receptoras se daría el reclutamiento de una de las hebras de estos pequeños RNA dúplex por AGO1 (Dunoyer et al. 2010a; b).

## 3. Propagación del silenciamiento a larga distancia

Para que el silenciamiento se propague (movimiento sistémico o a larga distancia), y pueda alcanzar diferentes órganos de la planta, es necesario al igual que con los virus, que la señal se mueva célula a célula y alcance el sistema vascular (*uploading*); luego se transporte dentro del mismo; y que tenga una salida de la vasculatura (*unloading*) para luego moverse hacia tejidos o células receptoras.

Las aproximaciones experimentales para identificar la señal sistémica de silenciamiento se basaron en extracción y análisis de flujo floemático (Yoo et al. 2004; Buhtz et al. 2008) y detección de RNAs en pies y copas de ensayos de injertos o *grafting* (Palauqui et al. 1997; Schwach et al. 2005; Brosnan et al. 2007; Molnar et al. 2010; Dunoyer et al. 2010a). Con ambas metodologías se sostiene que los RNA pequeños están involucrados en la señalización. Los RNA pequeños hallados en savia floemática son simple hebra. En células no vasculares una de las hebras del siRNA dúplex es destruida, y la presencia de ambas hebras individuales (como simple hebra) en floema indicaría que en este sitio no ocurre la asociación entre AGO y los siRNAs (Melnik et al. 2011).

Dunoyer et al. (2010a), mediante experimentos con injertos, usando líneas de *Arabidopsis* carentes de siRNAs endógenos de un transcripto con repeticiones invertidas (IR71), a las que se les colocó una copa salvaje con esas especies de siRNAs endógenos, observó que los pies acumulaban pequeñas cantidades de siRNAs IR71, lo que indicó que éstos se movieron desde la copa hacia el pie. Molnar et al. (2010), también mediante experimentos con injertos demostró que RNAs pequeños simple hebra de 24 nt se mueven sistémicamente de pie a copa. Así la presunción es que la señal del movimiento sistémico del silenciamiento serían los siRNAs de 24 nt.

En este trabajo de tesis, se han obtenido resultados que serán discutidos en base a estos conocimientos y evidencias experimentales, en cuanto a la infección viral, y al silenciamiento génico como sistema de defensa, y en la posibilidad de ser utilizado como una herramienta biotecnológica para enfermedades virales en cítricos.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### MATERIALES

I- Reactivos químicos

II- Aislamientos virales

III- Antisueros

IV- Cebadores

### MÉTODOS

V- Minipreparación de DNA plasmídico

VI- Clonación y secuenciación

VII- Colony PCR

VIII- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

IX- Reacciones enzimáticas

X- Extracción y purificación de RNA

XI- Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos

XII- TAS-ELISA-HRP

XIII- Reacción histoquímica para GUS (gen marcador)

XIV- Generación de plantas con simple o doble *heterografting*

XV- Inoculación viral mediante injerto



## I- Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia) o Mallinkrodt (New York, EE.UU.). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.), Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU.), PIERCE (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois EE.UU.), Molecular Research center (Cincinnati, EE.UU.), Fermentas (Vilnius, Lituania), BIONEER (USA Bioneer Inc., Alameda, California, Estados Unidos), Invitrogen (Carlsbad, California, EE. UU), Solis BioDyne (Tartu, Estonia), Bio Rad Life Science (Hercules, California, EE. UU.)

## II- Aislamientos virales

Se realizaron ensayos de desafío de plantas transgénicas con dos aislamientos de *Citrus psorosis virus* (CPsV) de origen argentino, tomados de la colección de agentes patógenos de cítricos de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Concordia (Entre Ríos), mantenidos bajo condiciones de invernadero, a 22-24 °C con un fotoperíodo de 16 horas. Los aislamientos son: CPsV 90-1-1, con síntomas típicos de psorosis A, mantenido en Naranja dulce Pineapple (*Citrus sinensis* L. Osb.) y Limón Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.), y CPsV 189-34 con síntomas típicos de psorosis B, necrosis y pústulas en hojas maduras y ramas jóvenes.

Se utilizaron también otros aislamientos de CPsV para el desarrollo de una técnica de detección de CPsV por RT-qPCR (capítulo 5). Los aislamientos incluidos en estos ensayos se detallan en la tabla 1 del capítulo 5, y abarcan diferentes tipos de psorosis (A y B), distribución geográfica, y sintomatología. En otros ensayos de este capítulo se utilizaron aislamientos de *Citrus tristeza virus* (CTV), causante de la enfermedad tristeza de los cítricos, y de *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV), otro ophiovirus que causa la enfermedad *big-vein* en lechuga (*Lactuca sativa*). Éstos se encuentran descritos en la tabla 2 del capítulo 5.

## III- Antisueros utilizados

### Comerciales:

Suero anti ratón IgG-HRP: Goat Anti-Mouse-IgG (H+L) – Peroxidase, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.; y Bio-Rad Laboratories.

Suero anti ratón IgG-HRP: Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate BIO-RAD

### No comerciales:

Antisuero policlonal en conejo: A376 (Alioto et al. 1999)

Antisuero monoclonal en ratón: MAbs 13C5 (Alioto et al. 1999)

### IV- Cebadores

Nombre	Secuencia nucleotídica	Región
D	5'CTCAATATGCTTGTGACTGC 3'	RNA 3 CPsV
C1	5'TCTTCCATCTGGAGTGAGGC 3'	
55i	5'GAAGGCAATTGCAATTAGGG 3'	
hp1-CP	5'AATCCTCGAGCTTGTTC AAGATGGAGC 3'	
hpCP2b	5'GGAGCATGGCTCAGCTCCTCACTG 3'	
CP1c	5' GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGG 3'	
CP3	5' GAGACCCTTGTGTAAAAACCAGCAC 3'	
A	5'TAGATCCATGCTCAGTCACC 3'	RNA 2 CPsV
B	5'TTGACAATGATGGACACTGG 3'	
U6	5' TTGCGTGTGCATCCTTGCGCAGG 3'	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Ubqt L	5' TCTTCACCTCGTGCTTCGTCTCCGT 3'	Gen ubiquitina de <i>Citrus sinensis</i>
Ubqt R	5' GTCCTGGATCTTGGCCTTGACGTTG 3'	

### V- Minipreparación de DNA plasmídico

Para la purificación de DNA plasmídico se utilizó un protocolo de lisis alcalina desarrollado por (Birnboim and Doly 1979) con algunas modificaciones: Una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano saturado en medio LB (*Luria Bertoni*) con el antibiótico adecuado se centrifuga a 14000 rpm durante 1 minuto. Este procedimiento se repite tres veces. El *pellet* obtenido se resuspende en 200 µl de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA); se agregan 300 µl de Solución II (0,2 N NaOH; 1% v/v

SDS) y se incubaba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se agregan 300 µl de Solución III (3M acetato de potasio pH 4,8) permitiendo la neutralización de la solución. Se incubaba en agua-hielo durante 5 minutos. Se realiza una centrifugación a 14000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se realizan dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol. Se centrifuga por 20 minutos a 14000 rpm; el *pellet* se lava con etanol 70% y se resuspende en 20 µl de agua bi-destilada estéril.

Esta preparación se utilizó posteriormente en una transcripción in vitro, por lo que se excluyó la digestión con RNAsa, y todos los tratamientos se realizaron en condiciones de esterilidad.

## **VI- Clonación y secuenciación**

Los fragmentos de DNA amplificados por RT-qPCR con los cebadores CP1c/CP3 fueron clonados en el sistema pGEM®-T *Vector Systems* (Promega) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes y transformados por electroporación en bacterias electro-competentes *E. coli* DH5α. Las bacterias transformantes se incubaron a 37°C en placas de LB/ampicilina/XGal/IPTG y se seleccionaron las colonias blancas. Se confirmó la presencia del inserto por colony PCR y se determinó su secuencia mediante secuenciación por método Sanger en la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma Nacional de Genómica CATG del Instituto de Biotecnología CICVyA - CNIA - INTA Castelar.

## **VII- Colony PCR**

La verificación de la presencia y tamaño de los insertos se realizó por PCR, con los cebadores CP1c/CP3. Para ello, se utilizó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en medio sólido que se resuspendió en 10 µl de agua bi-destilada estéril y se incubó a 100°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 14000 xg durante 10 minutos y se utilizó una alícuota del sobrenadante como molde en las reacciones de PCR utilizando las condiciones de la RT-qPCR con los cebadores CP1c/CP3.

## **VIII- Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de BIONEER (USA Bioneer Inc., Alameda, California, Estados Unidos). El fragmento de gel que contiene el DNA a recuperar se disuelve con 3 volúmenes de Buffer 1 (NaI 6M), calentando a 60°C por 20 minutos. A la agarosa disuelta se le agrega matriz de sílice (*glassmilk*), se mezcla y se incubaba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifuga durante 1 minuto a 13000rpm. Se descarta el eluido. Luego la suspensión de sílice se lava y centrifuga 2 veces con *Buffer 2* (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol). La columna se seca al aire para eliminar los restos de alcohol y se agrega agua bi-destilada estéril incubando



por 2 o 3 minutos a temperatura ambiente, seguida de centrifugación durante 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante contiene el DNA de interés.

## **IX- Reacciones enzimáticas**

### **IX- 1- Digestión con enzimas de restricción**

Se realizó una digestión con la enzima Sal I HC 50U/μl (promega), para linearizar el plásmido 3c3, que contiene el fragmento del gen *cp* utilizado para el transgén *ihpCP*, clonado en el vector pGEM®-T (Promega). Se digirieron 25 μg de DNA molde en las condiciones especificadas. Para corroborar que la digestión fue completa se analizaron los productos de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa incluyendo los controles de digestión correspondientes y marcadores de peso molecular.

### **IX- 2- Digestión con DNAsa**

Se trataron con DNAsa aquellas muestras de RNA que luego son analizadas por RT-qPCR (para cuantificar únicamente los mensajeros con identidad de secuencia, evitando contaminaciones con DNA). Se digirió 1 μg de RNA molde con 1 unidad de DNAsa (RQ1 *RNase-Free DNase*, Promega) en las condiciones especificadas. La reacción se detuvo incubando a 65°C durante 10 minutos con 1 μl de RQ1 stop solution.

### **IX- 3- Reacción de transferencia de fosfatos con polinucleótido kinasa**

Para marcar ribosondas radiactivamente (ver Northern blot) se utilizó la Polinucleótido kinasa (Thermo Scientific\* Fermentas T4 *Polynucleotide Kinase*, T4 PNK) que cataliza la transferencia de un fosfato gamma desde el ATP al extremo 5'-OH de una molécula de DNA, para marcar radiactivamente los oligonucleótidos que son utilizados como sonda para Northern blot. Esta enzima actúa en las condiciones especificadas (100mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.5mM 5 ft.-OH DNA, 0.05mM ATP, 0.1MBq/ml [gamma-<sup>32</sup>P]-ATP). Se incubó la mezcla de reacción durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo con 2μl de una solución 0,5M EDTA pH8 por cada μl de PNK utilizada.

## **X- Extracción y purificación de RNA**

La extracción de RNA total a partir de muestras de material foliar o vareta (tallo joven) se realizó utilizando el reactivo TRI Reagent (Molecular Research Center) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se partió de aproximadamente 200 mg de tejido; se extrajo el RNA con 1ml de TRI Reagent. Luego se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una segunda extracción con cloroformo para aumentar el nivel de

pureza del RNA a extraer. El RNA se resuspendió en 10 a 50 µl de agua bi-destilada estéril libre de RNAsa de acuerdo al tamaño del sedimento.

La concentración del RNA purificado se midió por Absorbancia a 260nm utilizando espectrofotómetro.

## **XI- Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos**

### **XI-1- Síntesis de cDNA (reacción de transcripción reversa, RT)**

Se realizó la síntesis del cDNA por retro-transcripción en 25µl de reacción, a partir de 1 µg de RNA total de tejido foliar o vareta. Se agregaron 0,5µg de cada cebador de interés y agua bi-destilada libre de RNAsa. Se incubó a 70°C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente en agua-hielo por 5 minutos. Se agregaron 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega), 25 U de RNAsin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega), 5 µl de dNTPs 10mM, y 5 µl del buffer de la enzima (5X). Se incubó a 42°C por 60 minutos. El producto generado en la reacción de RT se utilizó posteriormente como molde en reacciones de PCR a tiempo final, PCR semi cuantitativa y qRT-PCR.

### **XI- 2- Reacción de PCR a tiempo final**

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER). Para un volumen de reacción de 10 µl se agregaron 1 µl de buffer de Taq DNA polimerasa (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0,1% v/v Tritón X-100), 0,2 µl dNTPs (10 mM de cada uno), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, los cebadores directo y reverso a una concentración final 1 µM y 0,25 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones generales de ciclado fueron de 5 minutos a 94°C como etapa inicial de desnaturalización, 36 ciclos de 10" a 94°C, 30" a la temperatura de apareamiento de cada par de cebadores y 50" (este tiempo varía de acuerdo a la extensión del fragmento a amplificar) a 72°C y una etapa de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa de una concentración de entre 1 y 2% (según el tamaño del amplicón a resolver), en buffer TAE 1X y en presencia de bromuro de etidio.

### **XI- 3- Reacción de PCR semi cuantitativa**

Esta reacción se llevó a cabo con el par de cebadores C1-D, en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones que la PCR a tiempo final, pero modificando el número de ciclos. En la optimización del protocolo se probó la amplificación con 15, 20, 25, 30 y 35 ciclos. En todos los casos se utilizaron 40ng de molde de cDNA. Las condiciones de amplificación óptimas fueron: 5' a 94°C, seguidas de 25 ciclos de 15'' a 94°C, 30'' a 48°C y 50'' a 72°C. La carga de RNA en cada muestra se normalizó con el gen ubiquitina, amplificando las muestras con el par de cebadores ubqtL/R, y las mismas condiciones de la PCR anterior. Los productos de PCR se analizaron mediante

electroforesis en gel de agarosa 1-2% en buffer TAE 1X y en presencia de bromuro de etidio. Se comparó la intensidad relativa de las bandas obtenidas en el amplicón C1-D, y el amplicón ubqt L/R, cuantificando el área y la intensidad de cada banda con el programa imageJ (National Institutes of Health, NIH. <http://imagej.nih.gov/ij/>).

#### XI- 4- Reacción de PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Las cuantificaciones de RNA mensajero por RT-qPCR (previo tratamiento con DNAsa y síntesis del cDNA) se llevaron a cabo en un ciclador Fluorescent Quantitative Detection System FQD- 48A (BIOER). Las mezclas de reacción tuvieron un volumen final de 25  $\mu$ l y 100ng de molde, cuando se utilizó IQSybr Green Super mix (Bio Rad); o 20  $\mu$ l de volumen de reacción y 40ng de molde si se utilizó 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus no ROX (Solis BioDyne). Se utilizaron los buffers y condiciones de reacción especificados por cada fabricante. En ambos casos se utilizaron los cebadores directo y reverso a una concentración a una concentración final 200nM. Las condiciones de ciclado en todos los casos fueron de 5 minutos a 95°C como etapa inicial de desnaturalización, 50 ciclos de 20" a 95°C, 30" a 56°C y 20" a 72°C y una etapa de elongación final de 5 minutos a 65°C. Finalmente se realizaron las correspondientes curvas de *melting* (fusión) en el rango de temperatura de 72-93°C. Las curvas de calibración para la cuantificación absoluta fueron generadas a partir de diluciones seriadas de los amplicones purificados y cuantificados. La concentración de los estándares utilizados en la curva de calibración fue calculada a partir de su absorbancia a 260nm y expresadas en n° de copias del amplicon por unidad de volumen. Se ensayaron por triplicado los estándares correspondientes a  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  copias del fragmento de DNA por  $\mu$ l. Los datos fueron analizados con el software incorporado al equipo, Line-GeneK FQD- 48A (BIOER TECHNOLOGY).

#### XI- 5- Preparación de sondas de DNA: marcación de oligonucleótidos con gamma $^{32}$ P-ATP

Las sondas fueron marcadas con gamma  $^{32}$ P-ATP por transferencia de fosfatos con polinucleótido kinasa, como indica el inciso IX- 3 de esta sección. Los moldes utilizados fueron oligonucleótidos que tienen identidad de secuencia con el RNA 3 de CPsV, dentro del ihpCP (cebadores listados en el inciso IV de esta sección) y  $\gamma^{32}$ P-ATP. Las sondas obtenidas se purificaron en una columna de cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-25 (Ilustra™ MicroSpin™ G-25 Columns, GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### XI- 6- Preparación de ribosondas marcadas con $\alpha^{32}$ P-UTP

La obtención del transcripto que se utiliza como sonda se realiza mediante transcripción in vitro utilizando el sistema comercial AmpliScribe™ T7 y T3-Flash Transcription kits de EPICENTRE Biotechnologies. La reacción se realiza según especificaciones del fabricante. Para ello se utiliza un DNA molde linearizado (apartado IX-1 de esta sección) que es purificado por gene clean. Para un volumen de reacción de 20  $\mu$ l se agrega 1  $\mu$ g del molde, 2  $\mu$ l de buffer T7, 1,8  $\mu$ l de los nucleótidos ATP, CTP, GTP (todos de



concentración inicial de 100mM), 5 µl de UTP (concentración inicial de 1mM) y 5µl de  $\alpha^{32}\text{P}$ -dUTP (3000 Ci/mmol), 2µl de DTT 100mM y 2 µl de la enzima T7. La reacción se incubó por aproximadamente 1 hora a 37°C. Las sondas obtenidas se purifican por cromatografía en columna de exclusión molecular Sephadex G-50 (Illustra™ MicroSpin™ G-50 Columns, GE Healthcare).

#### XI- 7- Northern blot para la detección de siRNA

Estas determinaciones se llevaron a cabo según el protocolo descrito en (Pall and Hamilton 2008), con algunas modificaciones. Alícuotas de aproximadamente 50 µg de RNA total se separaron mediante electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida acrilamida (17 % acrilamida, 7,0 M Urea en 0,5 X TBE) en el equipo Mini-PROTEAN TGX™ Gels (Bio Rad). Previamente se pre-corrió el gel durante 1 hora a 180 V. Se mezclaron las muestras con 1,5 volúmenes de buffer de siembra (Formamida desionizada, 2 volúmenes; de SB, 1 volumen), se incubaron 5 minutos a 95 °C y se enfriaron inmediatamente en agua-hielo. Se sembraron las muestras y corrió el gel a 110- 130 V hasta la salida del frente de corrida. Para aumentar la resolución de las especies de siRNAs con distinto tamaño se utilizó el equipo PROTEAN II XL (Bio Rad), cuyos geles poseen un tamaño de 18,5 x 20 cm. Se sembró la misma masa de RNA total. Se pre-corrió el gel a 350V durante 15 minutos, y luego se separaron los ácidos nucleicos, con el mismo tratamiento que en el caso anterior, a este mismo voltaje durante alrededor de 5 hs. Se tiñó el gel con Bromuro de Etidio y se observó en transiluminador con luz UV. La fotografía de esta tinción se utilizó en algunos casos como control de carga. Los ácidos nucleicos fueron transferidos a una membrana de nylon de carga neutra (*Amersham Hybond-NX, Nylon membranes optimized for nucleic acid transfer GE Healthcare*) mediante transferencia semi húmeda (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell BioRad Laboratories, California, EEUU), durante aproximadamente 1 h a 25 V (3 mA/cm<sup>2</sup> de gel). La membrana se fijó por *Cross linking* químico con N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimide hydrochloride y 1-metilimidazol (Sigma- Aldrich®).

Luego se procedió a la hibridación de la membrana con la sonda correspondiente (ribosonda marcada con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP o sonda de oligonucleótidos marcados con  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP). Dicha hibridación se realizó en 5X SSC, 2X Denhardt, 0.1% p/v SDS, 300 µg/ml DNA de esperma de salmón desnaturizado (Invitrogen) y 3 mg/ml tRNA de levadura desnaturizado (SIGMA) a temperaturas de hibridación que oscilaron entre 37 y 50°C, durante un *overnight* (una noche, alrededor de 12-16 hs). Después de 3 lavados en 2X SSC, 1X SSC y 0,2X SSC con el agregado de 0.1% p/v SDS a la temperatura de hibridación, la membrana se expuso a una placa radiográfica generalmente durante 1 a 30 días, según la intensidad de la marca. En algunos casos la carga de RNA de las membranas fue normalizada con los snRNA U6 de expresión estable en las plantas. La secuencia del oligonucleótido U6 se extrajo del genoma de *Arabidopsis thaliana* y está listado en la tabla de cebadores del apartado IV de esta sección. Se obtuvieron sondas marcando este oligonucleótido  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP con PNK (inciso IX- 3). La hibridación se realizó a 50 °C durante la noche y las señales se detectaron por autorradiografía.



## **XII- TAS-ELISA-HRP**

El inmunoensayo triple sandwich (TAS-ELISA-HRP, en adelante llamado sólo TAS-ELISA) fue realizado como lo describe Alioto et al. (1999), con algunas modificaciones. Las proteínas totales se extraen de 200 mg de tejido foliar por molienda en mortero con nitrógeno líquido y el tejido molido se resuspende en 1ml de *buffer* PBS conteniendo 0.1 % v/v de Tween 20, 2 % p/v PVP-40000 y 2.5 % p/v de leche en polvo descremada. Los pocillos se tapizan con el antisuero policlonal A376 con una dilución 1:7000 y la microplaca es incubada por 4 horas a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-T, alícuotas de las preparaciones de proteínas totales se agregan y se incuban a 4 °C *overnight*. Cada muestra se determina por triplicado. Luego de 5 lavados con PBS-T, los pocillos son incubados por 90 minutos a 37°C con una dilución 1:10000 del MAb 13C5 y luego de otros 5 lavados con una dilución 1:2000 del Antisuero Anti-ratón-IgG (H+L) conjugado a PEROXIDASA (HRP) por el mismo período. Se revela por el agregado del sustrato OPD (orto-fenil diamina) durante 30 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detiene agregando 50 µl de una solución 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente se realiza la lectura de DO a 492 nm. El tiempo total de ejecución del procedimiento es de 22 horas.

## **XIII- Reacción histoquímica para GUS (ensayo con gen marcador)**

Los materiales utilizados para este ensayo fueron cortes transversales de varetta, hoja y pecíolo de cítrico adulto. Dichos tejidos se ensayaron para la expresión del gen *uidA* (GUS) incubando *overnight* a 37°C en una solución del reactivo colorante (100 mM Tris-HCl pH 7, 2mM X-Gluc (5-Bromo-4cloro-3-indolil-β-D-glucuronic acid cycloheximide salt), 0,01% v/v Tritón-X100, 50 mM NaCl) (Cervera et al. 1998). Luego de la incubación con la solución del reactivo colorante se procedió al lavado del tejido con 100 mM Tris-HCl pH 7 durante 5 minutos. Este procedimiento se repite 2 veces. Posteriormente se fijó el tejido incubándolo con 1% v/v glutaraldehído en 100 mM Tris-HCl pH 7 durante 3 horas a 10°C. Se realizaron 3 lavados con 100 mM Tris-HCl pH 7 durante 5 min. Se decoloró el tejido de la clorofila presente incubándolo durante 5 minutos con una serie creciente de soluciones conteniendo etanol: 30 % v/v, 50 % v/v, 70 % v/v, 90 % v/v y 100 % v/v. Se rehidrató el tejido invirtiendo los lavados de la serie de etanol, manteniendo la muestra en 100 mM Tris-HCl pH 7.

## **XIV- Generación de plantas con simple o doble *heterografting***

Para la propagación de las líneas transgénicas y la generación de las plantas compuestas por un portainjerto y una copa se utilizaron como pie, plantines de *Citrus jambhiri* Lush (limón rugoso) de 12 a 14 meses de edad (el tallo principal debe tener como mínimo 1cm de diámetro). Para que el injerto pueda unirse a la planta receptora del injerto, ésta debe estar brotando, lo que indica una actividad o movimiento de savia propicio para el éxito del injerto.

Se injertaron dos tipos de material: yemas (protuberancias a los lados de las ramas que tienen la capacidad de brotar) o varetas (segmentos de tallo joven tomado de ramas laterales del árbol).

En el primer caso, se cortó una yema rodeada de un trozo de corteza. El corte abarca todo el espesor de la corteza y una finísima capa de lámina o de albura. Luego la yema seleccionada se coloca bajo la corteza de la planta a injertar. Para ello, en el tronco de la planta que servirá como pie, se realiza una pequeña escisión en forma de T invertida. Como indicación de que la planta pie está en condiciones de recibir el injerto, su corteza debe desprenderse con facilidad. Una vez que las cortezas de la yema a injertar y del pie entran en contacto, el injerto se fija utilizando una cinta plástica tipo *SaranWrap*. La parte apical de la planta receptora se dobla atándola a la base para favorecer el desarrollo del injerto. A las dos semanas de realizado el injerto se inspecciona para asegurar que prendió, retirando la atadura del mismo. Una vez que la yema brotó, y cuando haya alcanzado unos 10 cm de crecimiento, se corta la copa del pie (limón Rugoso) a unos 10-20 cm por encima del injerto.

Cuando el injerto se realiza por vareta, se realiza un corte horizontal, decapitando el tronco, y luego se practica un corte vertical, formando una T. Con el bisturí se evalúa si hay desprendimiento de corteza. A la vareta o estaca a ser injertada se le realiza un corte transversal sobre uno de los lados, y esa zona se pone en contacto con el tejido vascular del pie. Una vez que las cortezas del injerto y del pie entran en contacto, el injerto se fija utilizando una cinta plástica tipo *SaranWrap*, *y se hace una cámara húmeda cubriendo con una bolsa plástica hasta la base del tronco, para evitar deshidratación. Cuando la estaca injertada se ve turgente se retira la bolsa, alrededor de 20 días después.* Cuando la planta con doble o triple heterografting está desarrollada, puede ser analizada molecularmente, o bien desafiada con el virus.

## **XV- Inoculación viral mediante injerto**

El desafío se realiza mediante inoculación por injerto en forma de T-invertida con un trozo de corteza proveniente de un plantín infectado con el aislamiento de CPsV especificado. La planta es podada inmediatamente después de la inoculación por injerto.

Se toman las hojas de las sucesivas brotaciones y se evalúa la presencia del virus por observación de síntomas característicos de psorosis, o diagnóstico molecular.



## **OBJETIVOS GENERALES**

- Estudiar la expresión de los transgenes ihpCP y CP en plantas transgénicas madres de *Citrus sinensis* y sus propagaciones vegetativas.
- Analizar el movimiento sistémico de los productos de la expresión del transgén ihpCP y su efecto sobre el silenciamiento génico del gen *cp*, a través del injerto.
- Evaluar el efecto de la transmisión del silenciamiento génico sobre la resistencia a CPsV 90-1-1, homólogo al transgén ihpCP, a través del injerto
- Determinar la resistencia de las plantas transgénicas ihpCP frente a un aislamiento heterólogo de CPsV, representativo del síndrome de psorosis B.
- Desarrollar una nueva técnica de detección de la enfermedad psorosis de los cítricos y transgenes derivados de CPsV mediante RT-qPCR.





## Capítulo 1

### Expresión de los transgenes ihpCP y CP en plantas transgénicas madres de *Citrus sinensis* y sus propagaciones

A. Análisis de la expresión del transgén de plantas madres de líneas ihpCP de *Citrus sinensis* L. Osb y sus propagaciones sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto

B. Análisis de la expresión del transgén de la línea CP-18 de *Citrus sinensis* L. Osb sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto.





## INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado, uno de los intereses y en lo que se ha investigado y avanzado, es la generación de plantas cítricas transgénicas resistentes a CPsV, y otras enfermedades importantes de este cultivo (Furman et al. 2013).

En nuestro laboratorio, Zaneck (2007) avanzó en la aplicación de la resistencia derivada del patógeno (PDR, por *Pathogen-Derived Resistance*) utilizada con éxito en muchos casos para controlar las virosis a través de la transformación de plantas con fragmentos derivados del genoma viral (Anderson et al. 1992; Lapidot et al. 1993; Baulcombe 1994; 1996; Lomonossoff 1995; Palukaitis and Zaitlin 1997). A fin de lograr PDR en los cítricos contra CPsV, se obtuvieron 51 líneas transgénicas de *Citrus sinensis* L. Osb (naranja dulce Pineapple, NDP) que expresan los ORF 24K, CP o 54K de CPsV. Trece de estas líneas se desafiaron con el aislamiento CPV-4 de CPsV originario de Estados Unidos, del cual deriva el transgén. Ninguna de las líneas mostró resistencia ni tolerancia a la infección viral (Zaneck et al. 2008; Reyes et al. 2011b).

Luego, Reyes (2009) generó líneas transgénicas de NDP, que expresan transcritos ihpRNA con fragmentos de tres genes del aislamiento argentino 90-1-1 de CPsV bajo el promotor 35S: *cp*, *54k*, y *24k*. En la figura 1 se muestra la construcción para el gen *cp*. Las líneas transgénicas de NDP se denominaron ihpCP, ihp54K e ihp24K respectivamente, y fueron propagadas sobre el portainjerto limón rugoso (LR). Las líneas fueron desafiadas con el aislamiento homólogo CPsV 90-1-1, y de todas ellas, las que presentaron resistencia fueron las líneas ihpCP (Reyes et al. 2011a). Además, Reyes mostró que las líneas ihpCP resistentes acumulaban siRNAs derivados del transgén (siRNA-ihpCP), y después de ser inoculadas el nivel de siRNA no varió, indicando que probablemente el virus no alcanzaba a multiplicarse al menos lo suficiente como para aumentar los siRNA derivados del VIGS, y que la resistencia de estas plantas se debía a un mecanismo de silenciamiento génico.

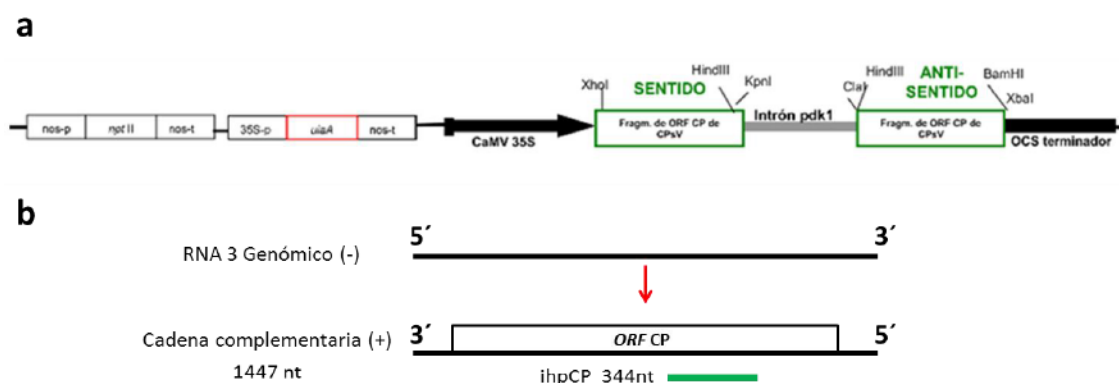


Figura 1. a. Construcción p35Sgusint-ihpCP con el que fueron transformados los NDP transgénicos ihpCP. b. Esquema del RNA 3 de CPsV de 1447 nt. Abajo, en verde, se muestra la ubicación del segmento utilizado para la construcción ihpCP, cuyo tamaño es de 344 nt (tomado de Reyes 2009).



Las líneas transgénicas con que contamos constituyen poderosas herramientas, no sólo como prueba de concepto biotecnológica, proyectando generar y comercializar plantas resistentes a CPsV, sino también para estudiar otros aspectos como son: la estabilidad de la expresión del transgén en la planta adulta y a lo largo de sus propagaciones, y fundamentalmente para responder preguntas acerca del silenciamiento a través del injerto en este sistema. A partir de estas herramientas, se desarrollarán estudios y se evaluarán sus implicancias biotecnológicas, como se verá en los siguientes capítulos.

## OBJETIVOS

A. Analizar la expresión del transgén de plantas madres de las líneas ihpCP de *Citrus sinensis* L. Osb y sus propagaciones sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto.

B. Analizar la expresión del transgén de las plantas madres de la línea CP-18 de *Citrus sinensis* L. Osb sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto.

## HIPÓTESIS

- A partir del transgén ihpCP se sintetiza el mRNA-ihpCP y siRNAs que derivan de él, y se acumulan en forma estable en la planta madre adulta y en sus propagaciones sobre *Citrus jambhiri* Lush.
- El transgén CP se expresa en forma estable en la planta adulta y sus propagaciones y no genera siRNAs derivados del mismo, es decir que los tejidos transgénicos CP no están silenciados para este gen.

## RESULTADOS

**A. Análisis de las plantas madres de líneas ihpCP de *Citrus sinensis* L. Osb y sus propagaciones sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto**

A.1. Selección de las líneas transgénicas ihpCP

Reyes (2009) obtuvo 6 líneas transgénicas de NDP que llevan la construcción ihpCP denominadas 6110, 6111, 6112, 6114, 6115 y 6116, que fueron desafiadas con el aislamiento homólogo CPsV 90-1-1.

El fragmento del gen *cp* seleccionado para esta construcción corresponde a la región central del RNA3 de CPsV (figura 1b), localizado entre los nucleótidos (nt) 600 y 944 (posición determinada de acuerdo a la secuencia del RNA3 del aislamiento CPV-4, ya que el RNA3 del aislamiento 90-1-1 está parcialmente secuenciado). La presencia del transgén ihpCP se evaluó primero por PCR y mediante la expresión del gen reportero (GUS); y se determinó por Southern blot que poseían entre 1 y 4 copias del transgén por línea (sin precisar cuántas copias exactamente posee cada línea) (Reyes et al. 2011a). La presencia de mRNA-ihpCP fue analizada por Northern blot, pero en ningún caso el transcripto derivado del gen ihpCP fue detectado. Además se determinó que en estas líneas existía acumulación de siRNA (Reyes et al. 2011a), como ya se mencionó. Excepto algunos individuos de la línea 6111, todos los demás resultaron asintomáticos en 3 brotaciones sucesivas, y no acumularon CPsV (determinado por TAS-ELISA y RT-PCR).

Para este trabajo de tesis, debido a limitaciones de espacio y mantenimiento de plantas, sólo se seleccionaron dos de las líneas: ihpCP 6110 y 6115 (en adelante ihpCP-10 y ihpCP-15). Ambas mostraron resistencia completa a la infección viral, y parecían presentar diferencias en los niveles de expresión de siRNA, siendo la ihpCP-15 la que más siRNAs acumulaba (Reyes et al. 2011a).

## A.2. Propagación de las líneas ihpCP

Se tomaron ramas de las plantas transgénicas madres ihpCP-10 y -15 y de la línea de NDP no transgénica 6099, que fue regenerada en paralelo a las líneas transgénicas, pero no transformada. De las ramas de estas plantas adultas se extrajeron yemas, y cada yema fue injertada sobre un plantín de aproximadamente 14 meses de edad de *Citrus jambhiri* Lush (Limón rugoso, LR) como portainjerto. Esta especie es utilizada como portainjerto por su vigorosidad, que acelera el tiempo de desarrollo del árbol y favorece el crecimiento de la copa.

Las plantas brotaron y crecieron bajo condiciones de invernáculo, con un fotoperíodo de 16 hs de luz y un rango de temperatura de 16-32°C (realizado en la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán). A estas propagaciones se las denominará plantas LR/ihpCP.

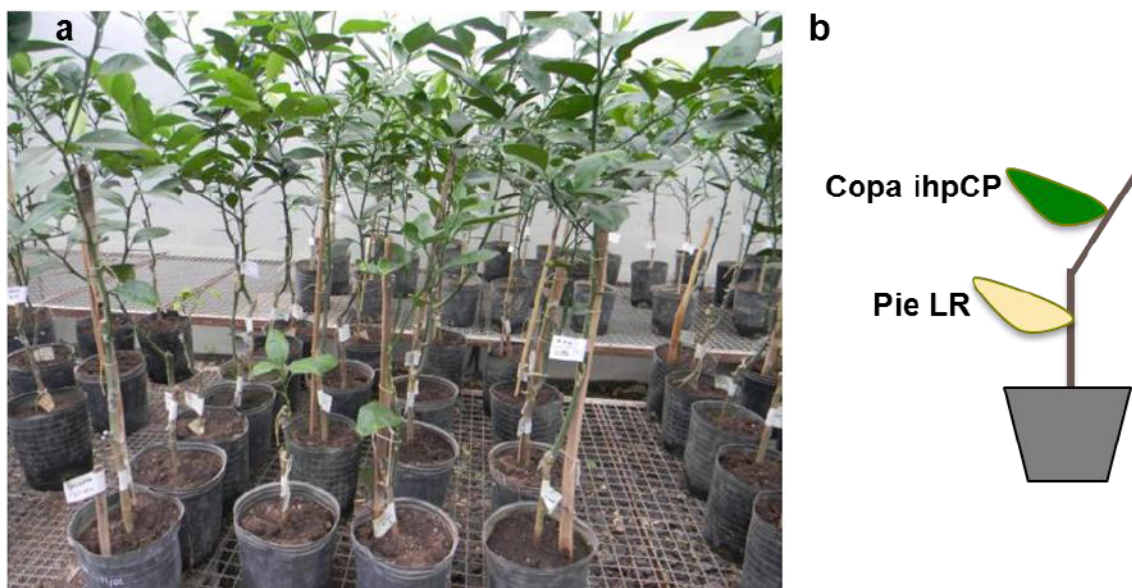


Figura 2. Propagación de yemas ihpCP mediante injerto sobre LR. Plantas LR/ihpCP. a. Grupo de plantas transgénicas de ihpCP propagadas sobre LR (tomada en la EEAO, Tucumán). b. Esquema que representa la línea ihpCP propagada sobre LR.

Se obtuvieron 30 individuos LR/ihpCP-10, 30 individuos con copa LR/ihpCP-15, y 10 con copa 6099 (que llamaremos simplemente NDP), todos sobre el portainjerto (pie) LR (figura 2a). Estos individuos estuvieron en condiciones de ser analizados y aptos para los ensayos posteriores después de 12 meses.

La combinación de dos especies cítricas distintas en una misma planta por injerto se llama en inglés *heterografting*. En esta tesis se adoptará esta nomenclatura. La figura 2b muestra el *heterografting* realizado en la propagación de estas líneas.

### A.3. Expresión del gen reportero *uidA* en distintos tejidos ihpCP

Debido a la dificultad para determinar la expresión del transgén ihpCP *in situ*, en estas líneas se evaluó la expresión del gen reportero *uidA* como aproximación a la expresión del gen de interés. Como puede verse en la figura 1a, cada gen de la construcción: *npTII*, *uidA*, e ihpCP, se expresa bajo su propio promotor 35S. Aunque no estrictamente, se esperaría que la expresión del gen ihpCP ocurriera en los mismos tipos celulares que el gen reportero, cuya expresión *in situ* es más simple de ser evaluada.

Para una primera selección de los brotes transformados, Reyes en su tesis doctoral (2009), realizó el ensayo histoquímico para censar la expresión del gen reportero *uidA*, en cortes transversales de brotes regenerados. En estas observaciones, se vio que el gen *uidA* se expresaba en altos niveles, en los distintos tejidos, todos ellos muy jóvenes, como se muestra en la figura 3.





Figura 3. Análisis de la expresión del gen reportero *uidA* por ensayo histoquímico de GUS en corte transversal de la base de un brote no transformado (izquierda) y transformado (derecha) en desarrollo (tomado de Reyes, 2009).

En este trabajo se quiso verificar que la expresión del gen *uidA* fuera estable en el tejido adulto y en sus propagaciones sobre LR. Para ello, se tomaron muestras de hojas, pecíolos (unión entre la hoja y el tallo) y varetas (tallo joven tomado de ramas jóvenes) de las copas ihpCP propagadas sobre LR, y se practicaron cortes con micrótopo que fueron sometidos a ensayo histoquímico de GUS y posterior observación al microscopio óptico (figura 4).

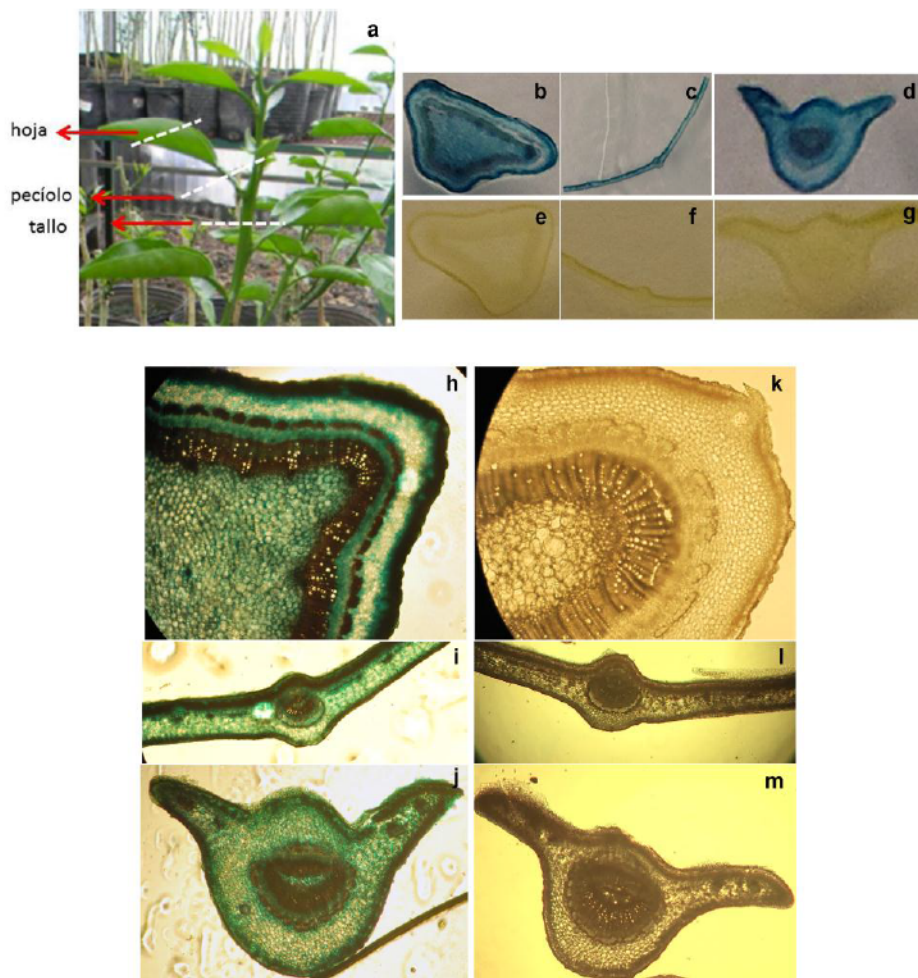




Figura 4. (Página anterior). Análisis de la expresión del gen reportero *uidA* por ensayo histoquímico de GUS. a. Planta de NDP en la que se señalan las zonas en las que se realizaron los cortes. b, c y d. Tinción de GUS de cortes transversales de tallo, hoja y pecíolo respectivamente, de la copa ihpCP de plantas LR/ihpCP, observadas a ojo desnudo. e, f y g. Ídem para NDP no tg. h, i, j. Observaciones microscópicas de los cortes ihpCP de vareta y hoja, con aumento 10X (h, i) y de pecíolo con aumento 25X (j). k, l, m: Ídem para los cortes de NDP no tg.

Como puede observarse, el color azul distribuido en todos los tejidos transgénicos, da cuenta de que hay actividad GUS, y por consiguiente que el gen reportero *uidA* bajo el promotor 35S sigue expresándose en toda la planta adulta y en sus propagaciones.

Esto indicaría que probablemente el transgén ihpCP también se exprese en todos los tejidos y en forma estable aún después de que la planta desarrollara al estado adulto, y a través de sus propagaciones, aunque no se tiene una proyección de su estabilidad en cada tipo celular.

#### A.4. Expresión del mRNA-ihpCP en tejido foliar de las plantas LR/ihpCP-10 y -15

Al momento de la generación de estas plantas transgénicas, la única herramienta metodológica disponible para la detección de transcriptos era el Northern blot, y cuando las líneas ihpCP se analizaron mediante esta técnica (Reyes 2009) no se detectó el mRNA-ihpCP en ninguna de las líneas transgénicas generadas. Esto era un resultado esperado, ya que el transcripto ihpRNA es auto-complementario, formando una estructura de horquilla que funciona como inductor del silenciamiento, siendo blanco de degradación.

En este trabajo de tesis, mediante el desarrollo de un protocolo para la detección cuantitativa de mRNA-ihpCP por RT-qPCR (ver capítulo 5), pudo detectarse y cuantificarse la acumulación del mRNA-ihpCP.

El mRNA-ihpCP fue cuantificado a partir del cálculo de concentración de copias del amplicón mediante extrapolación del Ct de la curva de calibración, normalizando con el gen ubiquitina (*ubqt*) de expresión estable en cítricos (ver capítulo 5). En la figura 5 se muestra esta determinación en las plantas madres ihpCP y en sus propagaciones.

Se analizó cada línea ihpCP y el control NDP mediante RT-qPCR por duplicado, en 3 determinaciones independientes de las mismas plantas. Tanto las plantas madres ihpCP como sus propagaciones acumularon copias del amplicón CP1c/3, aunque en cantidades muy bajas. El control NDP no mostró amplificación.

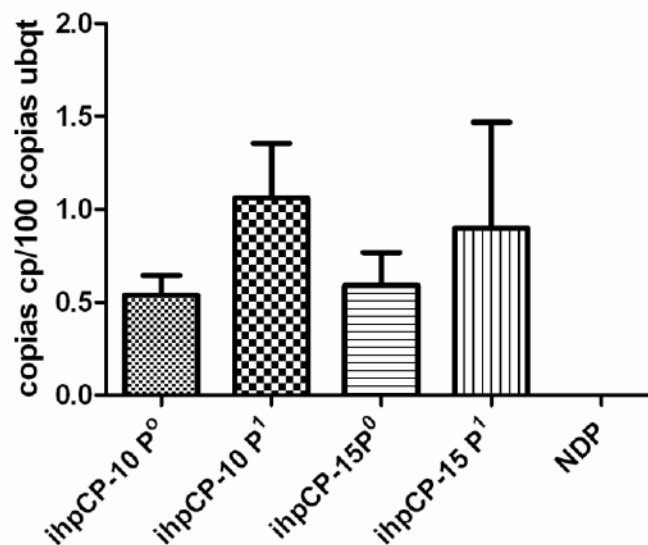


Figura 5. Nivel de expresión del mRNA-ihpCP en plantas madres (llamadas propagación cero, o P<sup>0</sup>) de las líneas ihpCP-10 y -15, y sus propagaciones (P<sup>1</sup>), y el control no transgénico (NDP), por RT-qPCR. Los valores expresados en el eje fueron calculados como el número de copias del amplicón CP1c/CP3 (copias cp) sobre 100 copias de ubiquitina (copias ubqt). El error estándar se indica por las barras superiores, con 95% de confianza.

Se realizó un análisis estadístico de estos resultados a través de un test one way ANOVA con un 95% de confianza que arrojó un *P-value* de 0,34 ( $P > 0,05$ ), indicando que las diferencias observadas entre los grupos de muestras no son significativas, es decir que los niveles de expresión del mRNA-ihpCP en las plantas madres y sus propagaciones LR/ihpCP son similares. Esto confirma la hipótesis de que el mRNA-ihpCP se expresa en forma estable en la planta adulta y sus propagaciones.

#### A.5. Acumulación de siRNA-ihpCP en tejido foliar y tallo de las plantas LR/ihpCP-10 y -15

Con el fin de determinar si el mRNA-ihpCP ha inducido el silenciamiento génico en las propagaciones de las plantas ihpCP, se determinó la acumulación de siRNAs específicos derivados del ihpCP como marcador de este proceso. Para eso se extrajo RNA total de un *pool* (conjunto) de hojas extraídas de 15 individuos de cada línea y se analizaron por Northern blot (figura 6).

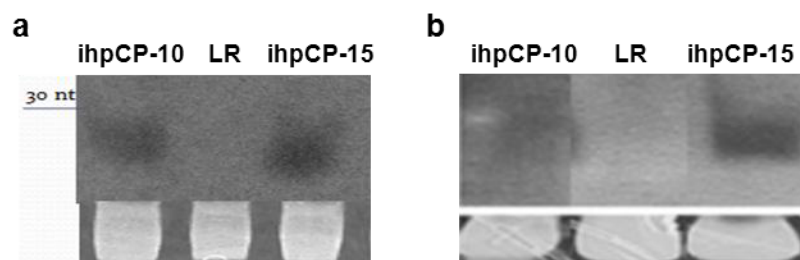


Figura 6. Acumulación de siRNA-ihpCP. a. en plantas LR/ihpCP-10 y -15, y de LR no transgénico (LR) como control negativo, por Northern blot. La membrana fue hibridada con una ribosonda con la secuencia del ihpCP marcada con  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP (ver Materiales y Métodos). Como marcador de peso molecular se utilizó un oligonucleótido de DNA de 30 nt cuya posición se indica a la izquierda de la membrana. En el panel inferior se muestra el control de carga del gel teñido con bromuro de etidio (RNA ribosomales). b. de las plantas madres transgénicas ihpCP (tomado de Reyes 2009).

Se realizaron dos repeticiones de este blot con resultados idénticos. De la comparación de los blots de las figuras 6a y 6b se observó que las propagaciones LR/ihpCP-10 y -15 y plantas madres acumulan siRNAs, es decir que la expresión de siRNAs ha sido estable a través de las propagaciones. La ausencia de banda en el control LR confirma que la detección de los siRNAs es específica del ihpCP. Parecería existir una diferencia en las cantidades de siRNA acumuladas en las propagaciones LR/ihpCP-10, que presentan un nivel algo mayor que la planta madre, pero para confirmarlo se deben normalizar las intensidades de las bandas con una expresión estable como la del gen U6 (U6 snRNA) de *Arabidopsis* (Xie et al. 2005).

Existen reportes que indican que los tejidos metabólicamente más activos son fuente de producción de señales de silenciamiento, mientras que los menos activos son sumidero (Tournier et al. 2006). En base a estas observaciones, el tejido foliar, formado por hojas adultas, fotosintéticamente activas, sería el tejido fuente, y el tejido vascular (constituido en su mayoría por células fotosintéticamente menos activas) sumidero. Así, la mayor expresión del transgén, con la consecuente producción de siRNA, debería darse en el mesófilo de hojas adultas, tejido fuente. Considerando que las hojas representan preponderantemente al mesófilo, y el pecíolo de una hoja, al tejido vascular como previamente ha sido considerado por Tzarfati et al. (2013), se analizó la acumulación de siRNAs en tejido foliar y, como aproximación, en varetas jóvenes de las plantas ihpCP mediante la técnica de Northern blot, y se compararon los resultados (figura 7).

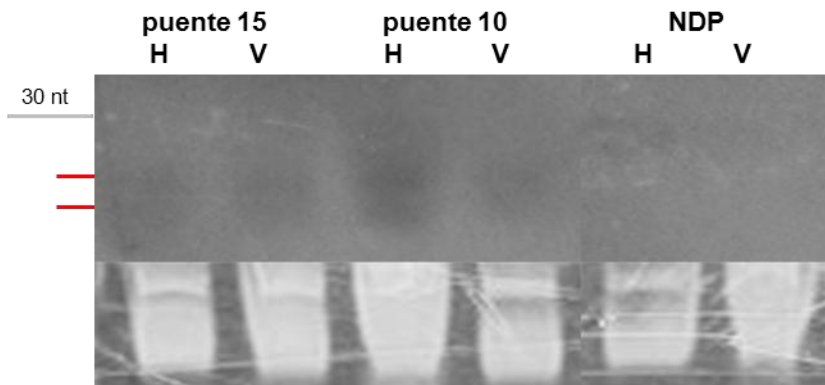


Figura 7. Acumulación de siRNA-ihpCP, en plantas LR/ihpCP-10, -15 y control no tg (NDP), en hojas (H) y tallos jóvenes (varetas, V), por Northern blot hibridado con sonda de oligonucleótidos con secuencias homólogas a los fragmentos ihpCP, marcados radiactivamente con  $\gamma^{32}\text{ATP}$ . El panel inferior muestra el control de carga teñido con bromuro de etidio (RNA ribosomales). Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de DNA de 30 nt cuya posición se indica a la izquierda, en gris. Los segmentos rojas indican la posición de las dos bandas de siRNA.

De la figura 7 se desprende que los siRNA son acumulados en hojas y tallos jóvenes, y sus cantidades relativas de acumulación no presentan diferencias marcadas mediante Northern blot. Si bien la acumulación de siRNA-ihpCP en las varetas de las plantas LR/ihpCP-15 parece ser mas baja, también lo es el control de carga, por lo que no podría considerarse una diferencia significativa. Aún así, recién con la determinación de snRNA U6, como control de carga se podrá determinar si realmente existieran diferencias significativas.

Además, se observa una doble banda de siRNAs, sugiriendo que hay por lo menos dos tamaños. Se encontró una mejor resolución de las especies de siRNA, mediante optimización de la electroforesis del Northern blot, como se explica en el siguiente apartado.

En resumen, las líneas ihpCP-10 y -15 expresan siRNA-ihpCP en forma estable, tanto en hojas como en tallo, y tanto en las plantas madres como en sus propagaciones.

#### A.6. Especies de siRNA generadas en las plantas ihpCP

Existen numerosos reportes bibliográficos, citados en la Introducción General, que muestran las especies moleculares implicadas en el silenciamiento. La referencia más frecuente es a dos tipos de siRNAs: los de 21-22 nt, y los de 24 nt tanto en plantas herbáceas modelos (Dunoyer et al. 2010 a,b) como en frutales leñosos (Kundu et al. 2008; Ruíz-Ruíz et al. 2011). Por lo tanto, en base a los resultados mostrados en el apartado anterior, se optimizó la metodología de Northern blot de RNA pequeños (ver Materiales y Métodos) para aumentar su resolución e indagar en las especies de siRNA que se generan en las plantas ihpCP. De esta manera se distinguieron dos bandas claramente resueltas (figura 8).



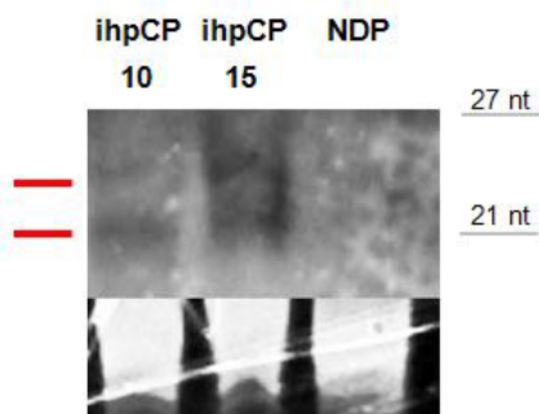


Figura 8. Especies de siRNA presentes en las plantas LR/ihpCP-10 y -15. Análisis por Northern blot de los siRNA-ihpCP expresados en tejido foliar de plantas LR/ihpCP -10 y -15 y del control NDP. El blot fue hibridado con sonda de oligonucleótidos de secuencias del ihpCP marcados radiactivamente con  $\gamma^{32}\text{ATP}$ . El panel inferior muestra el control de carga del gel (RNA ribosomales). Los segmentos grises de la derecha marcan las posiciones de los marcadores de peso molecular de 21 y 27 nt (oligonucleótidos de DNA). Los segmentos rojos de la izquierda indican las posiciones de las bandas de siRNA.

La posición de la banda de menor tamaño coincide con la del oligonucleótido de 21 nt. Tomando como referencia los marcadores de 21 y 27 nt, el tamaño de la banda superior correspondería a 24 nt. Cabe aclarar que los marcadores de peso molecular son oligonucleótidos de DNA, cuya distancia recorrida en la electroforesis puede no coincidir con la de los siRNAs. Entonces, podemos decir que los tamaños de estas especies, corresponden aproximadamente con las especies de 21-22 nt y 24 nt reportadas en plantas modelo.

#### A.7. Acumulación de mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en el pie LR

Hasta aquí se ha estudiado en detalle la expresión del transgén ihpCP y sus siRNAs derivados, en tejidos ihpCP (copa) propagados sobre LR. Con el fin de determinar si los siRNAs provenientes de la copa ihpCP son capaces de movilizarse a través del injerto, y descender hacia el pie por flujo vascular, se analizó la acumulación de siRNAs por Northern blot en hojas del pie de LR.

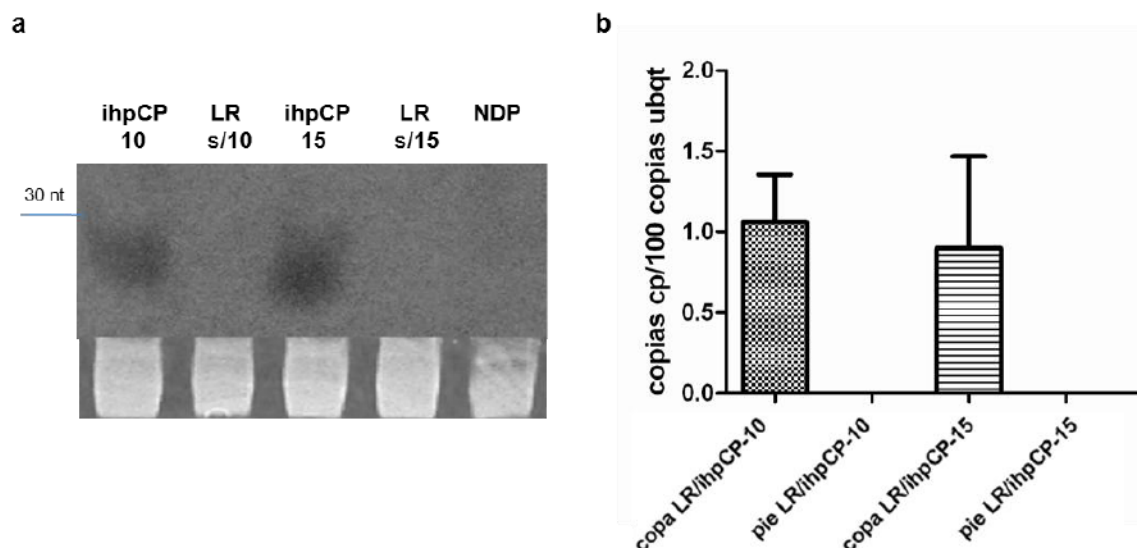


Figura 9. a. Acumulación de siRNA-ihpCP en las copas ihpCP y los pies LR no tg sobre los que fueron injertadas, por Northern blot hibridado con la ribosonda-ihpCP marcada con  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP. Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de 30 nt. Como control de carga del gel se muestra la tinción con bromuro de etidio (RNA ribosomales), en el panel inferior. b. Acumulación de mRNA-ihpCP en las copas ihpCP y los pies LR, por RT-qPCR. Los valores expresados en el eje fueron calculados como el número de copias del amplicón CP1c/CP3 (copias cp) sobre 100 copias de ubiquitina (copias ubqt). El error estándar se indica por las barras superiores, con 95% de confianza.

Como control, en paralelo se analizaron las copas ihpCP de las plantas LR/ihpCP-10 y -15, resultado ya mostrado previamente. En la figura 9a se puede observar que los siRNAs no fueron detectados en el pie LR, tanto en las plantas que poseen copa ihpCP-10 como con la -15. La ausencia de siRNA podría deberse a la falta de movilización de los siRNAs, o al bajo nivel de acumulación en esos tejidos, es decir, por debajo de un nivel detectable por esta técnica. Por otro lado, a pesar de no ser detectados podrían estar moviéndose hacia el pie, lo que induce a la hipótesis de que aunque estuvieran presentes, el proceso de amplificación de la señal no ocurriría en el pie no tg.

Tampoco se halló mRNA-ihpCP en hojas del pie de LR por RT-qPCR, es decir que este mRNA no se moviliza hasta al pie o lo hace por debajo de niveles detectables por ésta técnica (figura 9b).

Las determinaciones en el pie LR se realizaron con unas pocas hojas producto de la escasa brotación, ya que el pie del árbol tiende a depender del desarrollo foliar de la copa, y por ende no brotar (constituye el tronco); y aún más difícil es contar con tallo joven, por lo que no se realizaron determinaciones en este tejido.

La movilización de estas especies (mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP) desde el tejido ihpCP será objeto de estudio en el capítulo 2, utilizando otro sistema de estudio.

En resumen, en el pie de LR no se encontró mRNA-ihpCP ni siRNA-ihpCP, ambos generados de la copa ihpCP-10 y -15.

## B. Análisis de la línea CP de *Citrus sinensis* L. Osb sobre *Citrus jambhiri* Lush como portainjerto

Es de interés en esta tesis analizar líneas de NDP que portan el gen *cp* de CPsV, como herramienta para el estudio de la movilización del mRNA del transgén *ihpCP*, y transmisión de la señal del silenciamiento génico a través del injerto, como se explicará en el capítulo 2. Por lo tanto, en este apartado se analiza la línea utilizada para tales fines. La transgénesis de las líneas CP fue analizada por Zaneck (2007), determinando la presencia del transgén por PCR, y expresión del gen reportero (GUS), el número de copias por Southern blot (en los que se hallaron entre 1 y 4 copias del transgén por línea), acumulación de RNA mensajeros por Northern blot (en la que todas mostraron niveles detectables del mRNA-CP), y expresión de la proteína CP por TAS-ELISA con muy bajos niveles (Zaneck et al. 2008), pero no se evaluó la acumulación de RNA pequeños (siRNA) provenientes del probable silenciamiento génico de los transgenes.

Para los experimentos de esta tesis se seleccionó la línea CP-18, que porta una única copia del transgén y presenta un alto nivel de acumulación de mRNA-CP, determinado por Northern blot. Los niveles de proteína CP se midieron en esta línea, y resultaron al límite de la detección por TAS-ELISA. Sin embargo, los niveles de la proteína CP de la línea CP-18, en determinaciones posteriores, repetidas en varios ensayos durante este trabajo de tesis, no fueron diferentes de las plantas no tg. Este resultado podría deberse a que la planta es adulta, y el nivel de expresión podría haber cambiado, o a limitaciones en el método de detección utilizado (como se discutirá en el capítulo 5). Por lo tanto, los niveles de proteína no fueron convenientes de evaluar como marcador del nivel de silenciamiento en estas plantas, que es uno de los objetivos.

### B.1. Expresión del mRNA-CP

Para determinar el mRNA-CP de la línea CP-18 y descartar la detección del DNA del transgén, se optimizó un tratamiento de las muestras donde se realizaron distintas combinaciones de retro-transcripción y tratamiento con DNasa, y RT-PCR convencional. Este método sirvió además para determinar la integridad del mRNA-CP de la línea CP-18. Además, para cuantificar el nivel de acumulación del mRNA-CP se aplicó RT-qPCR utilizando diferentes cebadores. Toda la optimización se describe en las figuras 10, 11 y 12 y se detalla a continuación.

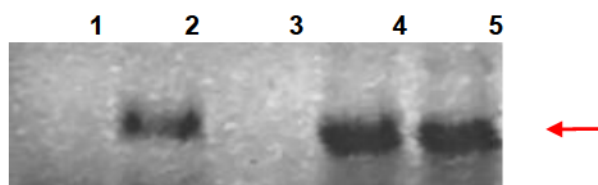


Figura 10. Análisis de los productos de RT-PCR con el par de cebadores C1/D a partir de ácidos nucleicos extraídos de hojas de la línea CP-18, mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5%-bromuro de etidio. Calles 1: agua; 2: sin DNasa y sin RT; 3: con DNasa y sin RT; 4: con DNasa y RT; 5: sin DNasa y con RT. La flecha roja indica la banda de aproximadamente 700 bp correspondiente al amplicón.



Para la determinación de la integridad del transgén, se utilizaron los cebadores C1/D que amplifican un fragmento de 700 pb representativo del mRNA-CP (ya que los amplicones de una RT-qPCR son más pequeños). En la figura 10 se observa la amplificación proveniente del DNA del transgén CP (calle 2), confirmando su presencia. De la calle 4, y controles se observa que el protocolo está optimizado para la detección específica del mRNA-CP.

Para la cuantificación del mRNA-CP se ajustaron dos protocolos de RT-qPCR realizados bajo las mismas condiciones de amplificación con dos pares de cebadores: el par ya utilizado para el mRNA-ihpCP (CP1c/CP3) que amplifica un fragmento de la CP incluida en el transgén ihpCP, cuya optimización se describe en el capítulo 5, y el par 55i/C1, que amplifica un fragmento de la CP por fuera del fragmento ihpCP.

La figura 11 muestra la curva de calibración de la RT-qPCR con los cebadores 55i/C1. El gen de referencia utilizado para normalizar la cuantificación es ubiquitina, al igual que para el par CP1c/3, utilizando los mismos cebadores (ubqt L/ubqtR). De las curvas de calibración de los amplicones 55i/C1 y ubqtL/R se extrajo la correlación entre el Ct y el número de copias. Luego se normalizó el número de copias de *cp* con el de *ubqt*.

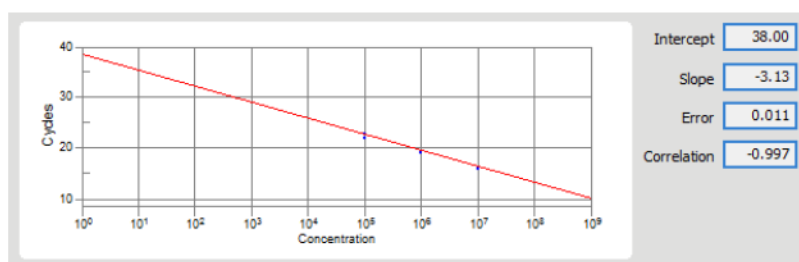


Figura 11. Curva de calibración para la RT-qPCR con el par de cebadores 55i/C1. En el panel superior se muestra la emisión de fluorescencia del SYBR® Green de las muestras utilizadas para los estándares. En el panel inferior se grafican los valores del ciclo umbral (Ct) versus el número de copias del fragmento de ADN cuantificado correspondiente a  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  del amplicón 55i/C1 (estándares). A la derecha se encuentran indicados los parámetros de regresión lineal de dicha curva.

El amplicón 55i/C1 posee un tamaño de 144 bases, y está localizado en el extremo 3' de la cadena positiva del RNA3 de CPsV (ubicado entre los nucleótidos 1058 y 1202, posición determinada de acuerdo a la secuencia de CPV-4). El segmento amplificado, al encontrarse en la región terminal del RNA3, a pesar de que el fragmento amplificado es pequeño da cuenta de la integridad del mensajero *cp*; debido a que los extremos del mRNA son frecuentemente menos estables. Además, posee la ventaja de estar ubicado por fuera del fragmento ihpCP, herramienta de utilidad en ensayos que se discutirán posteriormente.

En la figura 12 se muestra la cuantificación del mRNA-CP utilizando ambos pares de cebadores.



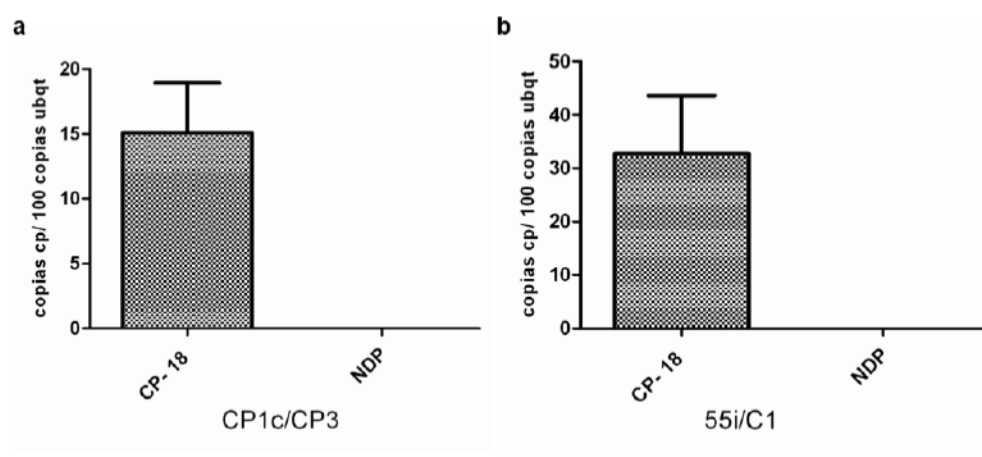


Figura 12. Acumulación de mRNA-CP en la línea CP-18 por qRT-PCR, usando los cebadores CP1c/CP3 (a) y 55i/C1 (b), normalizados con ubiquitina. El control no tg (NDP) no presenta amplificación con ninguno de los dos protocolos. Los valores se expresan como el número de copias del amplicón CP1c/CP3 ó 55i/C1 (copias cp) respecto de 100 copias de ubiquitina (copias ubqt). El error estándar es indicado por las barras superiores.

La cuantificación del mRNA-CP arrojó resultados del mismo orden por ambos protocolos de RT-qPCR. El número de copias de ambas determinaciones no necesariamente debe coincidir, ya que se trata de cebadores con eficiencias diferentes, y el valor expresado como el número de copias del amplicón CP1c/CP3 ó 55i/C1 (copias cp) respecto de 100 copias ubqt no representa una cuantificación absoluta, sino relativa.

De estos resultados se concluye que el mRNA-CP de la línea CP-18 (de ahora en más simplemente línea CP) se expresa en forma estable cuando es propagada sobre LR.

## B.2. Acumulación de siRNA-CP

Se determinó la acumulación de siRNAs provenientes del gen cp en la planta madre de la línea CP, injertada sobre un pie de LR, por Northern blot. Los resultados se observan en la figura 13.

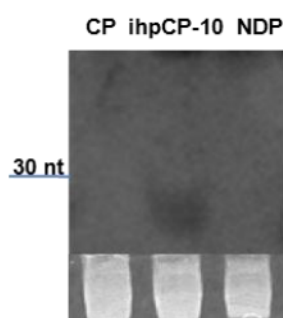


Figura 13. Análisis de la acumulación de siRNA-CP en la línea CP por Northern blot. Como control positivo se utilizó la línea ihpCP-10 y como control negativo NDP. Este blot fue hibridado con la ribosonda-CP, marcada con  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -UTP. Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de DNA de 30 nt cuya posición se señala con una línea a la izquierda. En el panel inferior se muestra el control de carga del gel teñido con bromuro de etidio (RNA ribosomales).

En este blot sólo se observó acumulación de siRNAs en la ihpCP-10, utilizada aquí como control positivo. La ausencia de banda en la línea CP indica que esta línea no acumula siRNAs en niveles detectables por Northern blot. Esta determinación fue repetida en 4 blots utilizando muestras de la misma planta madre, que arrojaron resultados idénticos.

Por lo tanto, se confirmó que la línea CP expresa el mRNA derivado del transgén y no presenta siRNAs detectados por Northern blot, por lo que se deduce que el gen *cp* de la línea CP no está silenciado post-transcripcionalmente.

## CONCLUSIONES

- El transgén ihpCP presenta una expresión estable en el estado adulto de las líneas ihpCP-10 y 15, y en sus propagaciones, tanto en el tejido foliar como en vareta joven.
- El transgén ihpCP bajo el promotor 35S se expresaría en todos los tejidos de la planta, en el estado adulto y en las propagaciones.
- En las plantas LR/ihpCP-10 y -15 los siRNA derivados del ihpCP se expresan en forma estable. Las especies de siRNA generadas en las líneas ihpCP-10 y -15 corresponderían a las de 21 y 24 nt.
- El mRNA-ihpCP y los siRNA-ihpCP producidos en la copa ihpCP no se detectan en el pie LR de las plantas LR/ihpCP-10 y -15.
- La línea CP expresa en forma estable el mRNA-CP, mientras que los siRNA derivados del mismo no se detectan, sugiriendo que no presenta silenciamiento génico cuando está injertada sobre un pie LR no tg.

- Se desarrollaron protocolos de RT-qPCR, que constituyen parte de las herramientas que permitirán cuantificar la expresión de los mRNA-ihpCP y mRNA-CP en forma diferencial, como se explicará más adelante.

## DISCUSIÓN

La amplia resistencia a CPsV alcanzada por las líneas ihpCP-10 y -15 al momento de su generación, las convirtió en una herramienta biotecnológica promisoría (Reyes et al. 2011a). En el presente trabajo se profundizó en el estudio de su comportamiento, a lo largo de su desarrollo al estado adulto y de las propagaciones sobre LR.

La estabilidad en la expresión del transgén ihpCP se analizó extrapolando la expresión del gen *uidA*, de expresión muy estable bajo el promotor 35S. En otros cultivos como algodón por ejemplo, se ha estudiado la expresión de los genes bajo el promotor 35S en distintos tejidos y estadios de desarrollo, concluyendo que este promotor se expresa en todos los tejidos y edades de la planta, excepto en estadios muy tempranos de la embriogénesis (Sunilkumar et al. 2002). En nuestro sistema se encontró que el gen *uidA* se expresa en el estado de regeneración *in vitro*, el estado adulto y las propagaciones. El gen ihpCP, por estar en la misma construcción y también bajo el promotor 35S, podría estar expresándose también en todos los tejidos, aunque luego la vida media del transcripto primario y/o el mRNA-ihpCP probablemente sea muy diferente. Es importante conocer la expresión del transgén ihpCP en los diferentes tipos celulares porque sirve para profundizar el conocimiento del sistema en cuanto al silenciamiento y la resistencia a virus en estos tejidos, y a través del injerto, como se explicará en los capítulos siguientes.

En los experimentos de este capítulo se determinó por primera vez la acumulación del mRNA-ihpCP. Hasta ese entonces se pensaba que ningún producto de la transcripción del transgén ihpCP se acumulaba, ya que era degradado por el mecanismo de silenciamiento génico post transcripcional (PTGS). También se probó la estabilidad de la producción de siRNA-ihpCP luego de la propagación. Los resultados obtenidos en este capítulo aportan evidencia experimental sobre la estabilidad de estas líneas transgénicas a lo largo del tiempo y luego de su propagación, de utilidad para estudios biológicos posteriores, y por sus implicancias biotecnológicas.

En los capítulos siguientes, la línea CP propagada sobre LR, será nombrada como LR/CP.

## PERSPECTIVAS

- El ensayo histoquímico de GUS y los Northern blot de siRNAs en hoja y vareta permitieron determinar que el transgén ihpCP y sus productos, se expresan en todos los tejidos. Se pretende ampliar este conocimiento, mediante la detección del mRNA-ihpCP *in situ*. Para ello es necesario optimizar una metodología, que permita la disección de tejidos y luego la detección mediante RT-qPCR *in situ*.
- Para confirmar los resultados obtenidos por Northern blot y poder utilizar este método como una herramienta semi-cuantitativa, al comparar las intensidades relativas de las bandas, es necesario normalizar la carga de RNA. Para ello las membranas de estas determinaciones volverán a hibridarse, con una sonda de U6, y se efectuará dicha normalización.
- Tanto las determinaciones por Northern blot como las realizadas por RT-qPCR se efectuaron a partir de un pool de RNA de los individuos de cada grupo de plantas: LR/ihpCP-10, LR/ihpCP/15 y LR/NDP. Para analizar si existieran variaciones dentro de cada grupo y analizar estadísticamente dichas variaciones, es necesario realizar estas determinaciones individuo por individuo, como también en nuevas propagaciones que permitan conocer aún más la estabilidad de la expresión.
- En estos ensayos se determinó por Northern blot la presencia de siRNA-ihpCP de dos tamaños de aproximadamente 21 y 24 nt en las líneas ihpCP-10 y -15. Mediante secuenciación masiva se podría conocer a que secuencias del RNA3 pertenecen y cuál es la abundancia relativa de las mismas.





## Capítulo 2

### Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP y silenciamiento génico del gen *cp* a través del injerto

- A. Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP a través del injerto
- B. Silenciamiento génico del gen *cp* a través del injerto
- C. Análisis del nivel de expresión del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en los puentes ihpCP, y silenciamiento génico del gen *cp* en las copas CP, en función del desarrollo foliar





## INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos centrales de esta tesis es profundizar en el estudio del mecanismo molecular que otorga resistencia a las líneas ihpCP frente a CPsV. Aún más, se desea probar la posibilidad de que las señales responsables de ese mecanismo viajen a larga distancia (sistémicamente) alcanzando nuevos tejidos susceptibles a CPsV.

Existen numerosos reportes sobre el movimiento sistémico de la señal del silenciamiento, y su transporte a través del injerto, en plantas herbáceas modelos (Palauqui et al. 1997; Voinnet et al. 1998; Yoo et al. 2004; Tournier et al. 2006; Kalantidis et al. 2008; Dunoyer et al. 2010 a; Dunoyer et al. 2010 b; Brosnan and Voinnet 2011; Kasai et al. 2011) y otros ya citados en la Introducción General. Se ha observado también que el silenciamiento génico generado en el pie puede establecerse en la copa (Palauqui et al. 1997; Mallory et al. 2003; Yoo et al. 2004), o desde la copa hacia pie (Tournier et al. 2006; Li et al. 2007). Sin embargo en frutales leñosos, como el manzano (*Malus*), se encontró que el silenciamiento no es transmitido a través del injerto en plantas adultas, mientras que sí lo es en estadíos tempranos del desarrollo, en experimentos *in vitro* (Flachowsky et al. 2012). El comportamiento de los cítricos en este aspecto no ha sido estudiado hasta esta tesis. Por lo tanto resulta de interés su estudio, dado que permitiría numerosas aplicaciones, entre ellas conferir resistencia a CPsV, como se describirá en los capítulos siguientes).

Por lo tanto, en este capítulo se plantean los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

- Determinar si existe movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP a través del injerto, en plantas LR/ihpCP/NDP.
- Analizar el silenciamiento génico del gen *cp* a través del injerto, en plantas LR/ihpCP/CP.

## HIPÓTESIS

- Los siRNA-ihpCP y el mRNA-ihpCP se transportan desde el tejido ihpCP hacia otros tejidos a través del injerto.
- El silenciamiento del gen *cp* en las copas es inducido por señales que viajan desde el puente ihpCP.



- La expresión de siRNAs en el tejido ihpCP y el silenciamiento del gen *cp* en las copas CP, no dependen del desarrollo del tejido foliar del puente ihpCP.

## RESULTADOS

### A. Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP a través del injerto

Para evaluar si el mRNA-ihpCP y los siRNA-ihpCP son capaces de transmitirse hacia el pie o la copa, se diseñó un sistema de estudio con las líneas de cítricos ihpCP y NDP mediante *heterografting*. Esta denominación señala que se injerta una especie sobre otra diferente, por ejemplo, NDP sobre LR, como también se refiere a la misma especie pero siendo una de ellas, una línea transgénica. En las plantas que utilizaremos en los siguientes ensayos, las líneas ihpCP fueron propagadas sobre LR (LR/ihpCP), y sobre el tejido ihpCP, se injertaron yemas de NDP (LR/ihpCP/NDP), como se muestra en la figura 1, y se explica a continuación.

#### A.1. Preparación del sistema de estudio por *heterografting*: Plantas LR/ihpCP/NDP

Para la generación de estas plantas se procedió a la propagación de yemas ihpCP sobre LR. Una vez que estas copas ihpCP alcanzaron un desarrollo suficiente (12-14 meses), sobre éstas, se injertaron yemas de NDP. La figura 1a muestra la planta con doble *heterografting* sin su follaje (podada), donde se pueden apreciar las zonas de los injertos. El pie LR conserva su nombre, la parte central se la llama puente, y la parte superior es la copa (figura 1a).

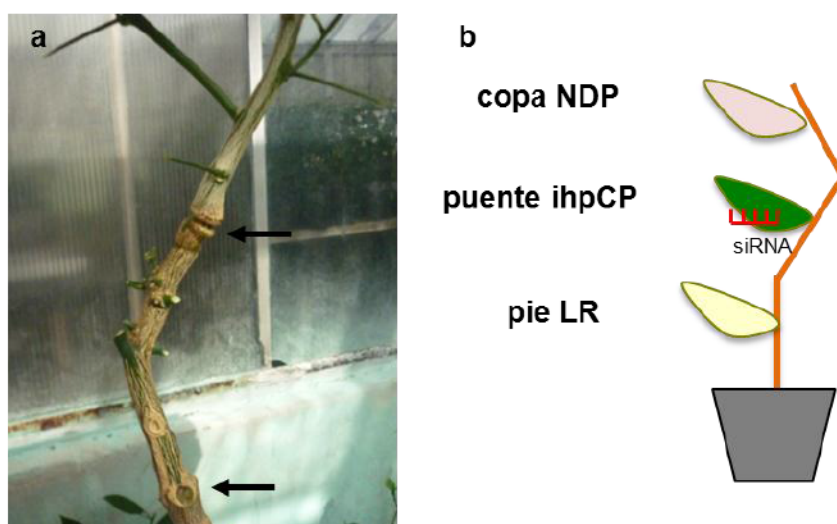


Figura 1. a. Planta con doble *heterografting* en el invernáculo. Las flechas indican las zonas de injerto. b. Esquema de las plantas con doble *heterografting*. El pie de LR no se representa con la hoja amarilla pálido. En la parte central se encuentra el puente de las líneas ihpCP, en el que se sintetizan los siRNA (representado con la hoja verde y los siRNA en rojo), y en la parte superior se encuentra la copa de NDP, esquematizada con una hoja rosa.

Para realizar estos ensayos se tomaron las mismas plantas LR/ihpCP-10 y -15, descritas en el capítulo 1, que poseían un único *heterografting*. Finalmente se obtuvieron 15 individuos LR/ihpCP-10/NDP, 15 LR/ihpCP-15/NDP, y 2 plantas control LR/NDP/NDP.

El tiempo demandado para el desarrollo final de las plantas fue mayor a tres años, ya que el desarrollo de cada parte se realizó a partir del injerto de yemas, requiriendo 12-14 meses para cada parte. Una alternativa es el injerto de varetas, es decir, tallos jóvenes con yemas, cuyo desarrollo sería más rápido. Sin embargo, el estado de desarrollo de cada parte puede ser decisivo en el movimiento y transmisión de la señal, y el disparo del silenciamiento, como se discutirá más tarde. Por lo tanto se decidió partir de tejido joven, en pleno desarrollo, como son las yemas, que tomarán contacto con el tejido generador de señal.

## A.2. Movilización del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP desde el puente hacia el pie y hacia la copa en las plantas LR/ihpCP/NDP

### A.2.1. desde el puente ihpCP hacia el pie LR

Como se determinó previamente (capítulo 1), en el pie LR de las plantas LR/ihpCP, no se detectaron siRNA-ihpCP ni mRNA-ihpCP que mostraran su transporte desde la copa ihpCP hacia el pie LR. Aún en el caso de que hubiera movimiento de mRNA-ihpCP o de los siRNAs hacia el pie, podría tratarse de un nivel suficientemente bajo para ser

detectado. Es importante aclarar, que este análisis fue realizado sólo una vez, ya que aunque se trate de LR, que es bastante vigoroso, es muy difícil que pueda brotar. Esto es aún más importante en un sistema de doble *heterografting*, donde el pie es más viejo, y en caso de brotar, se lo ha podado para promover el crecimiento de la copa. Por lo tanto, en las plantas LR/ihpCP/NDP no se contó con material del pie LR para ser analizado nuevamente en las plantas con doble *heterografting*.

#### A.2.2. desde el puente ihpCP hacia la copa NDP

Con el fin de determinar si los productos de la expresión del transgén ihpCP son capaces de transportarse por vasculatura y acumularse en las copas, se analizó la presencia del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en las copas de NDP. El análisis del mRNA-ihpCP se realizó mediante RT-qPCR con el par de cebadores CP1c/CP3 que como ya se mencionó, amplifica un fragmento contenido dentro de la secuencia del fragmento ihpCP. Los resultados se muestran en la figura 2.

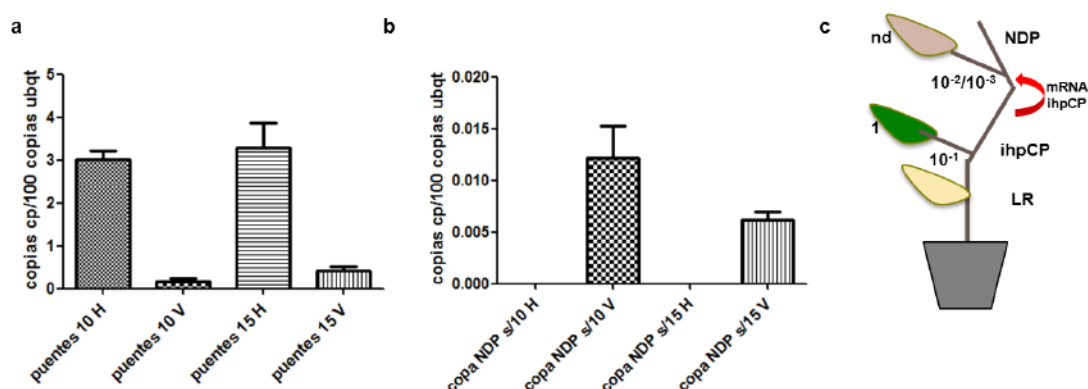


Figura 2. Movilización del mRNA-ihpCP de los puentes ihpCP-10 y -15 a las copas NDP, por RT-qPCR. a. en hojas (H) y tallo joven (varetas, V) de los puentes ihpCP-10 y -15 utilizados aquí como controles. b. en hojas (H) y tallo joven (V) de las copas NDP. Los valores expresados en el eje fueron calculados como el número de copias del amplicón CP1c/CP3 (copias cp) sobre 100 copias de ubiquitina (copias ubqt). El error estándar es indicado por las barras superiores. c. esquema de la movilización del mRNA-ihpCP señalada con la flecha roja, desde las hojas del puente hacia las hojas de la copa y el orden de las concentraciones del mRNA halladas en cada parte.

Se realizaron 2 determinaciones independientes de un pool de cada grupo de plantas. Se tomó muestra del puente, de hojas y de la rama que las contiene (vareta), dentro del escaso follaje que éste desarrolla. La vareta de la copa y sus ramas se encontraban a una distancia grande (mayor a 10 cm) de la zona del injerto.

Los valores promedio que arrojaron las muestras por RT-qPCR dividido por 100 copias de ubqt fueron: 3,01 y 3,28 para las hojas de las puentes ihpCP-10 y -15 respectivamente; 0,175 y 0,413 para sus varetas (figura 2a); cero para las hojas de las copas NDP sobre ambos puentes; y 0,01215 y 0,00612 para las varetas de las copas

NDP sobre ihpCP-10 y -15 respectivamente (figura 2b); es decir, los valores de concentración son del orden de 1 en las hojas de los puentes,  $10^{-1}$  en sus varetas,  $10^{-2}$  a  $10^{-3}$  en las varetas de las copas NDP e indetectable en las hojas de esta copa (figura 2c).

Estos resultados indican que la síntesis del mRNA-ihpCP se produce en las hojas ihpCP, y en las varetas del puente se encuentra un orden más bajo. Además, existe un transporte del mRNA-ihpCP desde el puente ihpCP a la copa, y por las concentraciones registradas, se ve un gradiente de concentración del mRNA-ihpCP desde el puente hacia la copa NDP, siendo en la copa dos órdenes más bajo, indicando que este mensajero es capaz de transportarse a otro tejido a través del injerto. Debido a que las concentraciones de mRNA-ihpCP van disminuyendo conforme aumenta la distancia a las hojas del puente, puede describirse como un efecto de dilución de las moléculas a medida que viajan, por distribución en los tejidos. Esto indica que el mRNA-ihpCP no se acumula en la copa NDP.

Cuando se analizó la presencia de siRNAs en puentes y copas en las plantas LR/ihpCP/NDP se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 3.

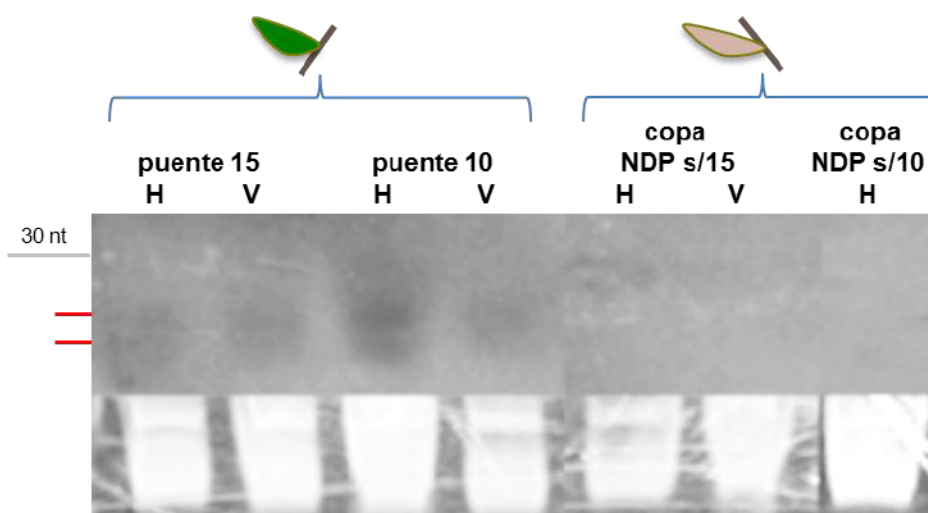




Figura 3. Movilización de siRNA-ihpCP desde los puentes ihpCP-10 y -15 a las copas NDP en plantas LR/ihpCP/NDP, por Northern blot hibridado con sonda de oligonucleótidos de secuencias homólogas al ihpCP marcados radiativamente con  $\gamma^{32}$ ATP. Puentes ihpCP (  ) -10 y -15, en hojas (H) y tallo joven (varetas, V) y copas NDP (  ) en hojas (H) y tallo joven (V). Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de DNA de 30 nt cuya posición se señala con el segmento gris. Los segmentos rojos indican las bandas de los siRNA-ihpCP. En el panel inferior se muestra el control de carga del gel teñido con bromuro de etidio (RNA ribosomales).

Como se ve, no se detectó siRNA en ninguna parte de las copas NDP analizadas, mientras que en el tejido ihpCP hay acumulación de siRNA tanto en hojas como en vareta. En las hojas de la copa NDP, al igual que para el mRNA-ihpCP, el hecho de no detectar siRNA no significa que no exista un transporte hacia esos tejidos. Lo mismo ocurre en la única muestra de vasculatura de las copas NDP sobre ihpCP-15. La



acumulación de siRNA en el tallo joven de las copas NDP injertadas sobre los puentes ihpCP-10 no fue determinada por falta de material, ya que la poda de las pocas ramas laterales que poseían, ponían en riesgo posteriores análisis sobre estos individuos.

Si bien se trata de dos metodologías diferentes, el descenso de un orden observado entre el nivel de mRNA-ihpCP de las hojas y el de las varetas, no se correlaciona con los niveles de siRNA-ihpCP. Ello puede deberse a la sensibilidad de cada técnica, o bien puede estar manifestando una diferencia entre la expresión y el transporte de estas dos moléculas.

Entonces se ha confirmado la movilización del mRNA-ihpCP desde el puente ihpCP hacia la copa NDP, pero no así de los siRNA-ihpCP, por lo que es posible aceptar parcialmente la hipótesis planteada inicialmente. De acuerdo al conocimiento actual, podemos suponer que los siRNA-ihpCP, especies participantes del silenciamiento génico, se están moviendo a través del injerto (Dunoyer et al 2010a,b) en cantidades inferiores a las detectables con la metodología disponible.

## **B. Silenciamiento génico del gen *cp* a través del injerto**

Además de evaluar el transporte de mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP a larga distancia, y su acumulación en tejidos de la copa, se analizó si en estas copas había silenciamiento génico. Para investigar si el tejido ihpCP tuviera la capacidad de desencadenar en forma no autónoma de célula el silenciamiento a través del injerto, se usó el procedimiento de *heterografting* que fuera usado por Brosnan et al. (2007) en *Arabidopsis thaliana*; aplicado al sistema cítrico. Similarmente, en este trabajo se monitoreó si el silenciamiento que presentan las plantas ihpCP se transmite a larga distancia.

### **B.1. Preparación del sistema de estudio por *heterografting*: plantas LR/ihpCP/CP**

En este sistema, el silenciamiento génico a través del injerto fue estudiado en plantas LR/ihpCP/CP. Además de las plantas LR/ihpCP-10/NDP y LR/ihpCP-15/NDP presentadas en el apartado anterior, en paralelo se prepararon 2 grupos de 15 individuos cada uno: LR/ihpCP-10/CP y LR/ihpCP-15/CP, y un grupo control de 5 individuos LR/NDP/CP.

La selección de la planta LR/ihpCP/CP, es decir, con la copa CP, se justifica en base a reportes que afirman que para que ocurra silenciamiento génico a través del injerto es necesario que la señal sea amplificadas, requiriendo de la presencia de un RNA target específico de secuencia en el tejido donde la señal es descargada (Palauqui et al. 1997; Tournier et al. 2006; Shaharuddin et al. 2006). Por esto, utilizando la copa CP se puede medir la degradación del mRNA-CP, *target* del silenciamiento, mediante una técnica cuantitativa como es la RT-qPCR.

La expresión del mRNA-CP y la ausencia de acumulación de siRNA-CP en la línea CP fueron confirmadas en el capítulo 1, en las plantas LR/CP. Se realizó una comparación entre los niveles de mRNA-CP de las plantas LR/CP y LR/NDP/CP por RT-qPCR y los resultados fueron indistinguibles, por lo que en los ensayos se utilizó LR/CP como

control, ya que se disponía de mayor material foliar (el material foliar de las plantas LR/NDP/CP comprometía los ensayos del capítulo 3).

Cabe recordar que la línea CP expresa el mRNA-CP proveniente del aislamiento CPV4 de CPsV, mientras que los puentes ihpCP expresan el mRNA-ihpCP y los siRNA-ihpCP del aislamiento 90-1-1. El alineamiento entre la secuencia del RNA3 de CPV4 y el fragmento ihpCP 90-1-1 arroja un porcentaje de homología del 85%. Entonces se estimó que varios de los siRNA-ihpCP de 90-1-1 poseerían identidad de secuencia con el mRNA-CP de CPV4. Para apoyar esta hipótesis se utilizaron dos programas de predicción de siRNAs potencialmente efectivos: *siRNA design* (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) y *Block-iT™ RNAi designer* (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>). Se obtuvo por ambos programas en forma coincidente una secuencia de siRNA con el *score* máximo (mayor confianza en la predicción, nivel 5) con inicio en el nucleótido 291 del fragmento ihpCP, otras con nivel 4 de confianza en las posiciones 13, 214, y 323, y con nivel 3 en las posiciones 209, 213, 220 y 301. Los resultados confirman que la secuencia ihpCP genera especies de siRNA, con una mayor probabilidad de generación de estas especies hacia el extremo 3' del fragmento ihpCP. Alineando los siRNA predichos con la secuencia de CPV4, se halló que todos se aparean, aunque con uno o dos nucleótidos no homólogos, indicando que es probable que en la copa CP se pueda establecer el silenciamiento del gen *cp* de CPV4.

## B.2. Cuantificación del mRNA-CP en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP

Los niveles de mRNA-CP de las copas CP de las plantas se cuantificaron por RT-qPCR con los cebadores 55i/C1, que amplifican fuera del fragmento ihpCP, discriminando así entre el mRNA-ihpCP y el del mRNA-CP, y por RT-PCR semi-cuantitativa, para asegurar que la detección corresponda a mRNA-CP completos y no probables productos de su degradación. La cuantificación del mRNA-CP por RT-qPCR se muestra en la figura 4.

Se realizaron dos determinaciones independientes cuyos promedios se muestran en la figura 4, en la que se observa que la copa CP sobre LR (no tg), arrojó un valor promedio de 33 copias de mRNA-CP /100 copias ubqt, mientras que en el caso de las copas CP sobre puentes ihpCP-10 y 15 sus cocientes promedio fueron 8 y 4 respectivamente, es decir que hubo una disminución en los niveles de mRNA-CP de 4 a 8 veces en las copas CP sobre ihpCP con respecto a las copas CP control sobre LR.

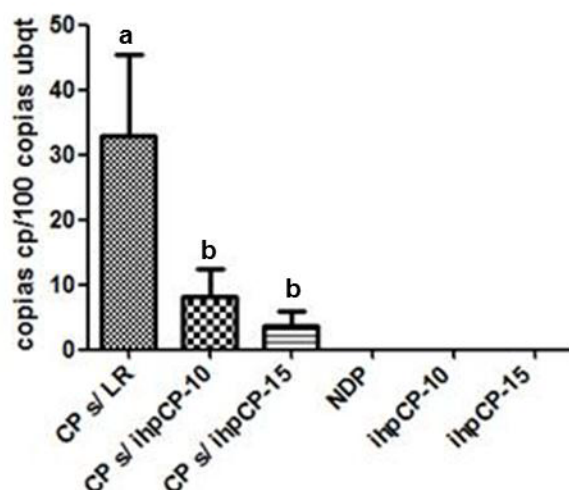


Figura 4. Cuantificación del mRNA-CP en la copa CP de plantas LR/ihpCP/CP y plantas LR/ihpCP por RT-qPCR con los cebadores 55i/C1. Cocientes promedio de copias del amplicón por cada 100 copias de ubiquitina, determinado en hojas de la copa CP injertadas sobre puente ihpCP (s/ihpCP-10 y -15); y de puentes ihpCP de plantas LR/ihpCP-10/CP, LR/ihpCP-15/CP, y NDP. Las barras superiores indican el error estándar. Se realizó un test estadístico de comparación de a pares (test de Tukey) para determinar si las diferencias medidas por RT-qPCR son significativas, que se indican con a y b.

Así se confirmó que los niveles de mRNA-CP encontrados en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP son significativamente inferiores a los de las copas CP en las plantas LR/CP, y que la degradación del mRNA en la copa CP ocurre tanto con el puente ihpCP-10 como con el puente -15, sin diferencias significativas entre ellos. Esto podría explicarse por la degradación específica de esos mensajeros mediante silenciamiento inducido desde el puente ihpCP, que expresa la señal que viaja sistémicamente hacia la copa.

Por lo otro lado, el mRNA-CP no fue detectado en los puentes ihpCP-10 y -15, indicando que el mRNA-CP no viaja al puente, o que está por debajo del límite de detección, que además, podría deberse a su degradación en el tejido ihpCP.

Para confirmar que los niveles medidos por RT-qPCR corresponden al mRNA-CP completo, se utilizó una PCR semi-cuantitativa con el par de cebadores C1/D, que generan un amplicón de mayor tamaño (700 bases). En la optimización de este protocolo se determinó que el ciclado óptimo para la PCR semi-cuantitativa es de 25 ciclos (el resto de los detalles técnicos de estas determinaciones se explican en el capítulo de Materiales y Métodos).

Posteriormente se procedió a la cuantificación de los mRNA-CP mediante RT-PCR a 25 ciclos, y su normalización con ubiquitina como gen de referencia.

En la figura 5 se muestra que en el puente ihpCP-10 los cebadores C1/D no detectan el mRNA-ihpCP, como era de esperar, y por lo tanto son específicos para el mRNA-CP. Esta determinación no fue realizada sobre el puente ihpCP-15, por falta de material foliar.



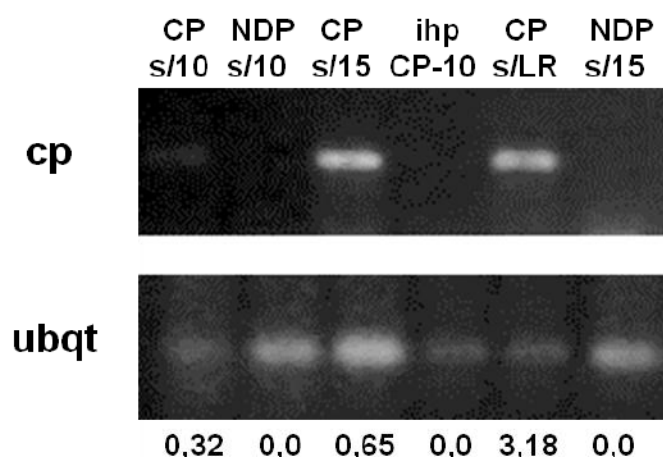


Figura 5. Cuantificación e integridad del mRNA-CP en la copa CP de plantas LR/ihpCP/CP, por PCR semi-cuantitativa. Productos de PCR a 25 ciclos de amplificación de: copa CP sobre puente ihpCP-10, copa NDP sobre puente ihpCP-10, copa CP sobre puente ihpCP-15, puente ihpCP-10, copa CP sobre LR como control de mRNA-CP, y copa NDP sobre puente ihpCP-15. El panel superior muestra las bandas correspondientes a los productos de amplificación del fragmento C1/D (cp) y del fragmento ubqt L/R en el panel inferior como control de carga. Abajo se indican los cocientes de intensidad de la banda de cp sobre la de ubqt (ver materiales y métodos).

La copa CP sobre LR, presenta una acumulación de mRNA-CP cuyo cociente con ubqt es de 3,18, mientras que las copas CP sobre puentes ihpCP-10 y -15 arrojan los valores de 0,32 y 0,65 respectivamente. Se ve entonces una reducción de los niveles de mRNA-CP de entre 5 y 10 veces en las copas CP sobre los puentes ihpCP-10 y -15 respectivamente. Esta cuantificación se llevó a cabo en dos determinaciones independientes arrojando resultados similares.

Los resultados de la PCR semi-cuantitativa son coincidentes con aquellos obtenidos en las determinaciones por RT-qPCR. Las copas CP injertadas sobre puentes ihpCP acumulan una cantidad significativamente menor de mRNA-CP que aquellas injertadas sobre LR, sin diferencias marcadas entre ellas (sus valores son de 4 a 10 veces más bajos que el control con puente no tg). Por otro lado, el mRNA-CP tampoco fue detectado en los puentes ihpCP-10 por ninguna de las dos técnicas, indicando que este mensajero no se transloca hacia al puente, o bien, que allí es degradado.

### B.3. Determinación de siRNA en la copa CP de las plantas LR/ihpCP/CP

En el apartado anterior se determinó que existe degradación del mRNA-CP en las plantas LR/ihpCP/CP. Para poder concluir que este mensajero se ha degradado por medio del mecanismo de silenciamiento génico, en estas plantas se determinó la acumulación de siRNA-ihpCP en las copas CP. La figura 6 muestra siRNAs presentes en las copas CP en las plantas LR/ihpCP-10/CP y LR/ihpCP-15/CP tanto en hoja como en vasculatura (vareta), aunque las copas CP sobre puente ihpCP-15 se encuentran en el límite de su detección. Sin embargo, estas diferencias podrían deberse a un problema



de carga de RNA total en el blot, lo que se resolverá con la normalización con el snRNA U6.

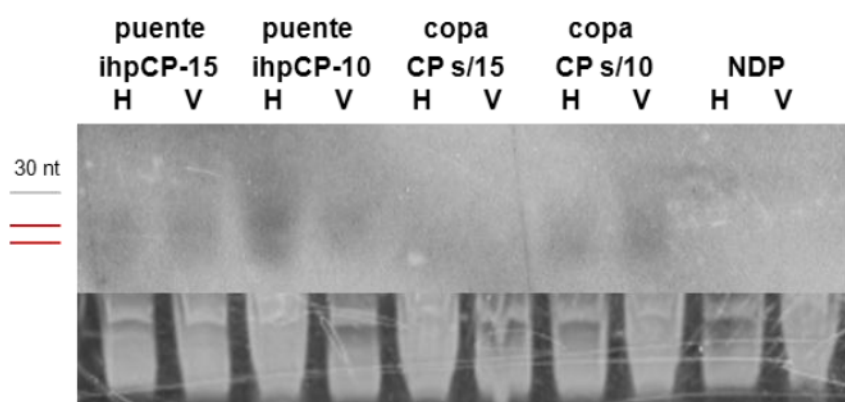


Figura 6. Acumulación de siRNA en las copas CP en plantas LR/ihpCP/CP por Northern blot. La sonda utilizada fueron oligonucleótidos cuyas secuencias corresponden al fragmento ihpCP marcados con  $\gamma$ 32ATP. Puentes ihpCP -10 y -15, en hojas (H) y tallo joven (varetas, V) y copas CP y el control de NDP no tg en hojas (H) y tallo joven (V). Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de 30 nt cuya distancia recorrida en el gel se señala con una línea gris. Las líneas rojas indican las posiciones de los siRNA. En el panel inferior se muestra el control de carga del gel teñido con bromuro de etidio (RNA ribosomales).

Debido a que estas muestras corresponden a conjuntos (*pooles*) de hojas representativas de cada individuo del grupo de plantas LR/ihpCP-10/CP, no es posible determinar si cada uno de ellos acumula siRNA, o si existen diferencias significativas entre los individuos. La determinación en cada individuo no fue posible por contar con una cantidad insuficiente de material de cada uno.

Cabe aclarar que la sonda utilizada detecta aquellos siRNA derivados de la región del fragmento ihpCP, los siRNA que se detectan podrían provenir del mRNA-CP, pero también del mRNA-ihpCP o los siRNA-ihpCP que hubieran viajado desde el puente ihpCP y alcanzado la copa CP.

Por lo tanto, se intentó distinguir entre siRNA-CP y siRNA-ihpCP, y para ello se diseñó una sonda que sólo detecte los siRNA-CP, cuyas secuencias se localizan fuera del fragmento ihpCP. Se utilizó una sonda de oligonucleótidos con secuencias fuera del ihpCP y también una ribosonda sintetizada a partir de un fragmento del extremo 3' del RNA3 de CPsV (fuera del ihpCP), pero ambas determinaciones presentaron problemas técnicos, por lo que aún no se cuenta con esa información.

La población de siRNA puede ser aumentada mediante amplificación del silenciamiento, en el que participan RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) que utilizan el RNA *target* como sustrato para generar siRNA secundarios (Himber et al. 2003). De acuerdo a esto podríamos suponer que ocurra una amplificación en las células de los tejidos CP, generando siRNA secundarios a partir de la degradación del mRNA-CP. Concomitantemente, en la misma copa CP, podrían generarse aquellos derivados del

mRNA-ihpCP, movilizado éste desde el puente, si consideramos el hecho de que el mRNA-ihpCP se transporta a través del injerto hacia la copa NDP, aunque no está demostrado para la copa CP. Esto último podría ser determinado por RT-qPCR con cebadores que sólo detecten el mRNA-ihCP y no el mRNA-CP.

Entonces, podemos decir que al menos en la copa CP de los puentes ihpCP-10 se acumulan siRNA, y que podrían ser la sumatoria de los siRNA derivados de la degradación del mRNA-CP de la copa y del mRNA-ihpCP que viaja desde el puente ihpCP-10.

Los resultados expuestos en esta sección indican que el mRNA-CP que se expresa en las copas de las plantas LR/ihpCP/CP, es degradado generando acumulación de siRNA, por lo que el mecanismo que dirige esa degradación sería el silenciamiento génico. Esto implica, que el silenciamiento del mRNA-ihpCP en el puente, no es autónomo de célula, sino que puede viajar a otros tejidos a través del injerto, como se evidencia en este sistema, donde la copa CP actuaría como sensor de este proceso. Este conjunto de resultados se esquematizan en la figura 7.

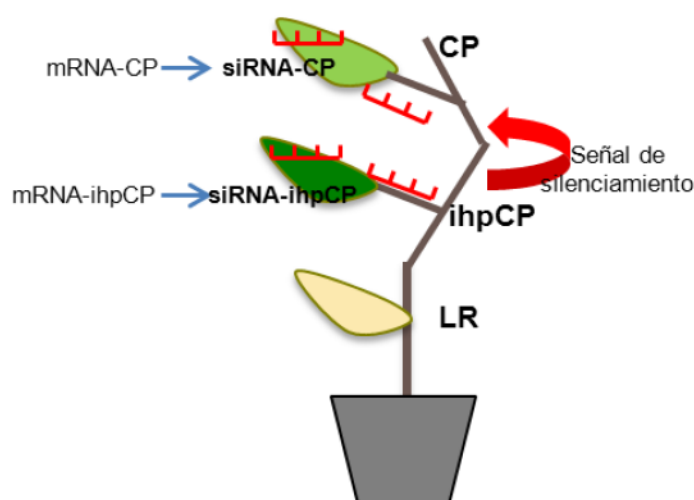


Figura 7. Esquema que resume los resultados del análisis de las plantas LR/ihpCP/CP frente al silenciamiento a través del injerto. Los símbolos rojos representan los siRNA.

### C. Análisis del nivel de expresión del mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP en los puentes ihpCP, y silenciamiento génico del gen *cp* en las copas CP, en función del desarrollo foliar

Como fue mencionado, el silenciamiento génico mediado por RNA es un proceso no autónomo de célula (Himber et al. 2003). En el tejido ihpCP, el silenciamiento podría estar ocurriendo en todas las células que expresan el transgén. Sin embargo cuando en el doble *heterografting* el tejido ihpCP se encuentra constituyendo el puente de la planta, esta parte está limitada en su desarrollo foliar, y ello representa un estado fisiológico que podría condicionar al silenciamiento, tanto en el mismo tejido ihpCP como a través del injerto.

Primeramente, para abordar este interrogante se analizó y comparó la acumulación de mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP, en el tejido ihpCP de plantas con simple *heterografting* (LR/ihpCP) y doble *heterografting* (LR/ihpCP/NDP) es decir cuando el ihpCP es la copa de la planta, cuyo desarrollo foliar es abundante (a), o cuando es el puente, y su follaje es escaso (e).

La figura 8 muestra los resultados de la acumulación de mRNA-ihpCP determinada por RT-qPCR con el par de cebadores CP1c/3, en estas plantas.

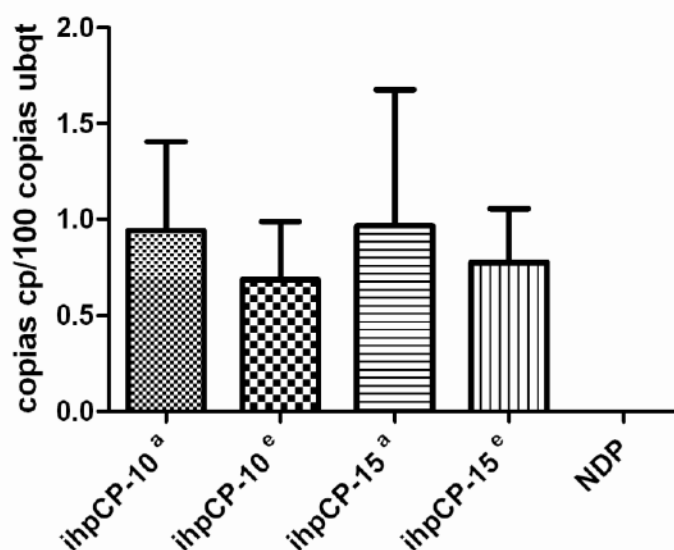


Figura 8. Cuantificación de mRNA-ihpCP en plantas LR/ihpCP-10 y -15, copas que poseen abundante desarrollo foliar (a), y como puente de las plantas LR/ihpCP-10/NDP y LR/ihpCP-15/NDP con escaso follaje (e), mediante RT-qPCR con *primers* CP1c/3, y control no transgénico NDP. Los valores se expresan en número de copias del amplicón CP1c/CP3 (copias mRNA-ihpCP sobre 100 copias de ubiquitina). El error estándar está indicado en las barras superiores.

Se realizó un único experimento con tres muestras independientes por cada condición sobre el cual se llevó a cabo un análisis estadístico de estos resultados, comparando los valores promedio de los triplicados de cada grupo a través de un análisis de varianza “one way ANOVA” con un 95% de confianza. Éste arrojó un *P value* de 0,1865 ( $P > 0,05$ ), indicando que las diferencias observadas entre los grupos de muestras no son significativas. Por la normalización con ubiquitina y el análisis estadístico de los datos, es posible decir que la acumulación del mRNA-ihpCP en el tejido ihpCP en las plantas LR/ihpCP y plantas LR/ihpCP/NDP no varía con el estado de desarrollo del tejido foliar de la planta, se encuentre como copa o como puente, tanto con la línea ihpCP-10 como con la ihpCP-15.

La figura 9 muestra los niveles de siRNA-ihpCP acumulados en las mismas muestras.

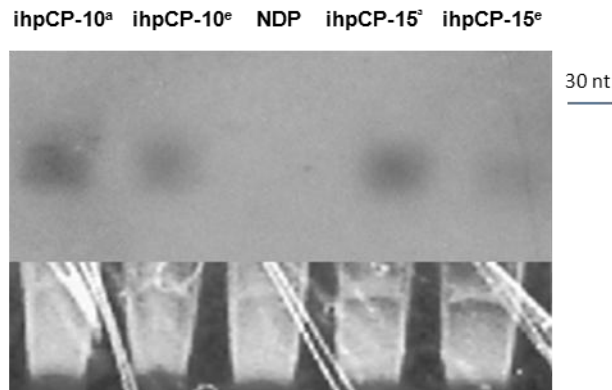


Figura 9. Análisis de la acumulación de siRNA-ihpCP en plantas ihpCP con abundante desarrollo foliar (a) y escaso (e), por Northern blot hibridado con sonda de oligonucleótidos de secuencias del ihpCP marcados radiactivamente con  $\gamma^{32}\text{ATP}$ . La calle central corresponde al control NDP (no tg). El panel inferior muestra el control de carga del gel de poliacrilamida (teñido con bromuro de etidio) en la zona de alto peso molecular (RNA ribosomales). Se utilizó como marcador de peso molecular un oligonucleótido de 30 nt cuya posición se indica a la derecha.

Si bien la normalización con snRNA U6 ayudará a la comparación de las intensidades de las bandas, en principio, habría una tendencia a que el tejido ihpCP como puente presenta menor acumulación de siRNA-ihpCP, que como copa (planta LR/ihpCP), que es cuando posee mayor desarrollo foliar.

El segundo interrogante era si el nivel de silenciamiento a través del injerto depende del desarrollo del follaje del puente. Para eso se analizaron las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP mediante RT-qPCR con *primers* 55i/C1, en plantas con puente ihpCP brotado y sin brotar. Los resultados no presentaron diferencias significativas (datos no mostrados), aunque muy variables.

Por lo tanto, con estos resultados preliminares, sólo podemos decir que podrían existir diferencias en la generación de siRNA en el tejido ihpCP cuando se encuentra como puente, o como copa. El resto de las comparaciones entre la condición de follaje abundante y escaso en el puente fueron no significativas. La tendencia indica entonces que no existirían marcadas diferencias entre ambas condiciones.

## CONCLUSIONES

- Existe un gradiente de concentración del mRNA-ihpCP desde las hojas del puente hacia las hojas de la copa NDP, indicando que el mRNA-ihpCP se transporta, aunque no se acumula en la copa.
- Los siRNA-ihpCP fueron detectados en tejido foliar y de vareta de los puentes de las plantas LR/ihpCP/NDP, pero no se detectaron en la copa NDP.



- Los siRNA-ihpCP fueron detectados en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP.
- Las copas CP injertadas sobre plantas ihpCP, fueron silenciadas para el gen *cp*, confirmando que el silenciamiento génico establecido en el tejido ihpCP es capaz de moverse a través del injerto.
- No existiría una dependencia de la síntesis de mRNA-ihpCP y siRNA-ihpCP con el estado de desarrollo foliar del tejido ihpCP, se encuentre como copa o como puente.

## DISCUSIÓN

En este capítulo se investigó en el silenciamiento a larga distancia mediante *heterografting*, para luego evaluar la resistencia frente a CPsV a través del injerto (capítulos 3 y 4).

El transporte de mRNAs funcionales de un tejido a otro de la planta, o incluso a través del injerto ha sido descrito en varios sistemas, y no parece ser simplemente una fuga de moléculas o de difusión, sino que sería un mecanismo bajo control y selectivo que probablemente involucre proteínas especializadas en ese transporte (Spiegelman et al. 2013; Goldschmidt 2014). Esto muestra que los mRNA no necesariamente son autónomos de célula, y existen varias hipótesis acerca de la ventaja de que el transporte se realice como mRNA y no como proteína. Una de ellas es que al viajar el mRNA, estaría viajando sólo una molécula para lograr expresar muchas moléculas de proteína en la célula blanco que se encuentra a larga distancia. Es decir, que el mecanismo sería a favor de aumentar o amplificar la señal que está viajando para expresar la proteína, y quizás una mecanismo de control. La forma en la cual se han evidenciado estos procesos ha sido mediante experimentos de *grafting*, pero aún no se conoce la maquinaria por la cual es llevado a cabo (Spiegelman et al 2013).

En este trabajo se mostró que el mRNA-ihpCP generado en el tejido ihpCP, es capaz de moverse a través del injerto, como lo demuestra el hecho de haberse detectado en las varetas de la copa NDP. Sin embargo, no se puede afirmar si es el mRNA-ihpCP completo es el que se mueve, o se trata de un fragmento del mismo, ya que fue detectado por RT-qPCR (un amplicón de 113 nt). Por otro lado, el hecho de que este mRNA viaje a otras partes de la planta, no significa que sea funcional. Dicho de otra manera, la presencia del mRNA-ihpCP podría tratarse simplemente de difusión a través del sistema vascular, o bien tener una función, como su participación en el mecanismo de silenciamiento sistémico a larga distancia. Un resultado interesante es que la concentración del mRNA-ihpCP detectado en las varetas del puente ihpCP es un orden menor al de las hojas. Esto podría deberse a que las células que sintetizan estos siRNAs estaría en menor proporción en la vareta que en las hojas, o que la síntesis fuera menor.

En cuanto a los siRNA-ihpCP se determinó que se acumulan en hoja como en vareta de los puentes de la línea ihpCP-10 y -15. El hecho de que se acumulen siRNA-ihpCP en vareta implica que se están transportando por vasculatura (la vareta está constituida predominantemente por tejido vascular) y/o que se sintetizan en los tejidos de la vareta probablemente a partir del mRNA-ihpCP allí presente.

La naturaleza de la señal de silenciamiento a larga distancia se ha estudiado por ejemplo en el gen endógeno IR71 de *Arabidopsis*, encontrando que tanto los siRNA de 21 y 24nt como el mRNA de dicho gen se mueven de pie a copa (Dunoyer et al. 2010a). En este reporte, se inclinan a que la señal del silenciamiento esta constituida por los siRNA, en base a su trabajo sobre movilidad de RNA pequeños no autónomos de célula (Dunoyer et al. 2010b), pero también señalan que, estrictamente no pueden descartar la intervención del mRNA en este proceso. En este trabajo, además del mRNA-ihpCP se encontraron siRNA-ihpCP de aproximadamente 21 y 24nt en la copa CP y en el tejido ihpCP. Por lo tanto, estrictamente, la señal de silenciamiento a larga distancia en este sistema podrían ser los siRNA-ihpCP, como también el mRNA-ihpCP o algún producto de su procesamiento, o bien la suma de estas moléculas que asegurarían la transmisión y quizás amplificación de la señal.

Otros reportes recientes en frutales leñosas apoyan que la señal de silenciamiento derivada de un *hairpin* son los siRNAs, como en cerezo dulce (*Prunus avium*) (Zhao and Song 2014a), donde determinaron, mediante secuenciación que los siRNA son los derivados del hairpin (Zhao and Song 2014b). Estos árboles frutales de carozo y sus enfermedades virales constituyen sistemas análogos al estudiado en esta tesis (cítrico/CPsV).

Existe otro caso, el del manzano, que ha sido el primero reportado en plantas leñosas, donde muestran, mediante *heterografting* de líneas transgénicas que portan el gen *uidA* y otras con *hairpin* para ese gen, que la señal de silenciamiento viaja a la copa produciendo el silenciamiento del gen. Sin embargo esto ocurre sólo si se realiza en plántulas *in vitro* (Flachowsky et al, 2012). Esto es, al realizarlo en plantas de invernadero, con mayor desarrollo, la señal no era transmitida a través del injerto. Los autores explican que probablemente la señal se transmita por el floema (ya que el xilema se encuentra libre de RNA) desde un tejido fuente a uno sumidero, y por ende, el estado *in vitro* haga posible ese transporte, mientras que cuando se enraizaron y se rusticaron en el invernadero, debido al hábito de ramificarse y por su lignificación, probablemente se provocó que la señal se disperse entre la masa foliar, sin lograr el silenciamiento (Flachowsky et al 2012).

En el caso de los cítricos, los reportes previos realizados con construcciones intron-*hairpin* fueron con el objetivo de desarrollar plantas que fueran resistentes a Citrus tristeza virus (CTV), encontrándose que en plantas en invernadero, tanto la copa como el pie eran inmunes a CTV, pero no se profundizó en el mecanismo, o en las moléculas involucradas en la resistencia, aunque si se determinó la presencia de los siRNA derivados del mRNA *hairpin* (Soler et al., 2012).

En nuestro caso, hemos trabajado con plantas en condiciones de invernadero, y las hemos propagado usando yemas de plantas adultas. Esto inclina a pensar que el uso de yemas, un tejido joven y del tipo sumidero (que se extrae de plantas adultas) bajo condiciones de invernáculo, podría ser la manera de manejar estas plantas leñosas, que a diferencia de los ensayos con manzano, fueron tejidos jóvenes, mantenidos en



condiciones *in vitro*, y que luego fueron pasados al invernadero, produciendo un cambio fisiológico que desfavoreció el silenciamiento sistémico del transgén. Por lo tanto, esto nos lleva a pensar que para estas prácticas debe tenerse en cuenta que los resultados pueden cambiar notablemente con la edad de la planta y el estado fisiológico tanto del portainjerto como del injerto. Aún así, hay que considerar que las pruebas a campo, en condiciones naturales podrían variar los resultados.

Por otro lado, se ha probado que cuando se injertan especies o variedades cítricas diferentes (*heterografting*) se inducen cambios en la expresión de miRNAs (Tzarfati et al. 2013) que explican algunos efectos observados en ciertas combinaciones de pie/copa compatibles o incompatibles, pero aún no se conoce que cambios conllevaría la expresión de transgenes. En este sentido, se sabe que los siRNA de 24 nt pueden actuar como inductores de cambios epigenéticos a través del injerto, y que estos siRNA dirigen la metilación del DNA (Molnar et al. 2010). En este trabajo de tesis esto no fue analizado, pero sí se puede afirmar que no se han producido alteraciones fisiológicas notables en este sistema de *heterografting*, ya que el patrón de crecimiento y la apariencia de la planta sometida a doble *heterografting* son indistinguibles de las de simple *heterografting* (Catalina Anderson, EEA-INTA Concordia, comunicación personal). También es de hacer notar que el uso de limón rugoso (LR) como pie de NDP, usados como sistema de estudio en estos ensayos, ha sido evaluado en estos aspectos por varias décadas sin reportar diferencias (Norma Costa, comunicación personal).

## PERSPECTIVAS

- Como se mencionó, se pretende estudiar la expresión de mRNA-ihpCP *in situ*, para tener más detalles de su expresión diferencial en tipos celulares y tejidos y su movilización a través del injerto. Hasta el momento no se contó con una herramienta metodológica que posibilite tales determinaciones. Por ello se prevé optimizar una metodología, que podría consistir en la disección microscópica de los tejidos, y detección con RT-qPCR. Así, se espera determinar la presencia de mRNA-ihpCP en la zona del injerto, en el tejido vascular de la copa CP y NDP, que se encuentre cercano al tejido ihpCP.
- Si bien la expresión estable del mRNA-ihpCP y del mRNA-CP indica que no habría silenciamiento génico transcripcional de estos transgenes en el estado adulto y a lo largo de las propagaciones sobre LR, sería importante determinar si en las plantas con doble *heterografting* (LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP) hubiera cambios epigenéticos en el tiempo. Esto es, razonando que una vez establecido el silenciamiento en la copa CP, esto generara cambios en la copa y/o en el puente ihpCP, a medida que se desarrollan. También en sucesivas propagaciones de yemas de las copas CP extraídas de las plantas LR/ihpCP/CP, que fueran injertadas sobre nuevos puentes ihpCP. Esto último, también de importancia desde el punto de vista biotecnológico y del manejo del cultivo.
- La detección de siRNAs generados a partir del mRNA-CP en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP es un punto importante a determinar, ya que aportaría

información acerca del funcionamiento de la transitividad del silenciamiento génico sobre el mRNA-CP. Por lo tanto, se podría optimizar ésta detección, distinguiendo entre los siRNA-ihpCP generados en el puente ihpCP de aquellos derivados del mRNA-CP. Así mismo sería interesante obtener las secuencias de los siRNAs generados mediante plataformas de secuenciación masiva.

- Aunque ya optimizada, la detección del mRNA-CP con cebadores que lo distingan del mRNA-ihpCP, será necesario aplicarla para completar varios interrogantes aún sin contestar como es su presencia en el puente ihpCP. Lo mismo ocurre con el mRNA-ihpCP en la copa CP. Se ha determinado su presencia en la copa NDP pero aún no en la copa CP, donde el par de cebadores CP1c/3 amplifica indistintamente el mRNA-ihpCP y el mRNA-CP. Sería necesario entonces, optimizar un protocolo de RT-qPCR con un par de cebadores que sólo detecte el mRNA-ihpCP. Confirmando esto, podríamos decir que el mRNA-ihpCP es una de las especies que viajan a la copa CP, como se ha determinado para la copa NDP. Por el contrario, su ausencia podría estar justificada en una degradación inmediata del mismo en la copa CP, lo que llevaría a la hipótesis de que este mRNA-ihpCP podría actuar como target del complejo RISC (cargado con los siRNA-ihpCP que también viajaron desde el puente) haciendo el sistema más eficiente.
- Las plantas que se utilizaron para estos estudios murieron por infección con patógenos del ambiente, y debido a que la preparación de estas mismas plantas con doble *heterografting* requeriría de 2-3 años, una alternativa sería realizar algunos estudios en cultivo *in vitro*. Este consistiría en realizar microinjertos de yemas de las plantas adultas, tomando sólo el meristema apical, sobre una plántula germinada *in vitro*. En este sistema se podría estudiar en detalle, el transporte de mRNA a través del injerto, realizando cortes histológicos del mismo a distintos tiempos post injerto. Si bien este sistema podría tener un comportamiento diferente al de la planta adulta en el invernáculo, aportará información de lo que ocurre en estas primeras etapas en la unión del injerto, donde las moléculas (y el virus) deben atravesar diversas barreras para alcanzar la copa. Por otro lado, el número de individuos podría ser mucho mayor, dando peso estadístico, y permitiendo además la aplicación de métodos destructivos para su análisis.





## Capítulo 3

### **Efecto de la transmisión del silenciamiento génico en las copas NDP y CP sobre la resistencia a CPsV**

- A. Evaluación de la resistencia de los puentes ihpCP y de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP. Efecto de la transmisión del silenciamiento génico en las copas NDP y CP sobre la resistencia a CPsV
- B. Determinación de la estabilidad de la resistencia de las plantas LR/ihpCP frente a CPsV
- C. Determinación del grado de resistencia de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP frente a CPsV con inoculación previa al *heterografting*





## INTRODUCCIÓN

Utilizando *heterografting*, que es la combinación de un portainjerto genéticamente modificado con una copa del tipo salvaje, o a la inversa, es posible proporcionar resistencia a plagas y patógenos, impartir tolerancia al estrés biótico y abiótico, o aumentar vigor de la planta y la productividad (Haroldson et al. 2012).

En nuestro sistema se pretende estudiar la resistencia frente a CPsV y la transmisión del silenciamiento a través del injerto.

Como ya se dijo, Zane et al. (2008) desarrollaron NDP transgénicos que expresaban la proteína CP de CPsV con el objetivo de obtener plantas resistentes, pero resultaron susceptibles frente a la infección con éste virus. Luego fueron generados los NDP transgénicos ihpCP que fueron desafiados con CPsV 90-1-1, un aislamiento argentino de PsA, cuya secuencia es 100% homóloga a la del transgén, resultando resistentes (Reyes et al. 2011a). En ese trabajo, las plantas LR/ihpCP fueron analizadas solo en las hojas de las copas, mientras que el pie no transgénico no fue analizado.

En este capítulo se analizarán las plantas desafiadas por Reyes et al. (2011), para determinar la estabilidad de su resistencia. Además se estudia la transmisión del silenciamiento a través del injerto, en vistas de su potencial como producto biotecnológico. En particular, si la resistencia a CPsV puede ocurrir en la planta completa generada mediante *heterografting*. El efecto de la resistencia desde el tejido ihpCP hacia otras partes no tg de la planta sería beneficioso desde el punto de vista biotecnológico, ya que se podrían cultivar cítricos con un pie o puente tg, y copa no tg, de tal manera que los frutos fueran no tg y por ende más fácilmente comercializables.

## OBJETIVOS

- Evaluar la resistencia frente a CPsV de los puentes ihpCP y de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP.
- Determinar si la resistencia que presentan las plantas LR/ihpCP10 y -15 frente a CPsV es completa y estable a través del tiempo.
- Evaluar el comportamiento frente a la infección con CPsV de las copas NDP y CP, injertadas posteriormente a la infección de los puentes ihpCP-10 y -15.



## HIPÓTESIS

- El *heterografting* y el desarrollo foliar del puente ihpCP de las plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP no afectan la resistencia frente a CPsV.
- Las plantas LR/ihpCP/NDP generan señales capaces de trasladarse a través del injerto, siendo suficientes para conferir resistencia al virus en las copas no transgénicas.
- Las plantas LR/ihpCP/CP generan señales capaces de trasladarse a través del injerto, que al llegar a la copa CP que expresa el target, producen una amplificación del silenciamiento, generando nuevos siRNA, que le confieren una mayor resistencia al virus en ese tejido.
- La resistencia que presentan las plantas LR/ihpCP-10 y -15 frente a CPsV es completa, y estable a lo largo de 2 años, y es transmitida a través del injerto.

## RESULTADOS

### A. Evaluación de la resistencia de los puentes ihpCP y de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP. Efecto de la transmisión del silenciamiento génico en las copas NDP y CP sobre la resistencia a CPsV.

#### A.1. Evaluación de la infección con CPsV en los puentes ihpCP-10 y -15 en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP

Si bien la resistencia de las plantas LR/ihpCP fue determinada (Reyes et al. 2011a), no se conoce el comportamiento de estas líneas como puente de plantas con doble *heterografting*. Con el fin de determinar el grado de resistencia de las líneas ihpCP frente a CPsV en esta nueva condición, se tomaron las plantas que fueron analizadas previamente (capítulo 2), y se desafiaron con CPsV 90-1-1, homólogo al transgén ihpCP.

Al momento del desafío se contó con 15 individuos LR/ihpCP-10/CP, 14 LR/ihpCP-10/NDP, 12 de LR/ihpCP-15/CP, y 14 LR/ihpCP-15/NDP; y 2 individuos de cada uno de los controles LR/NDP/NDP y LR/NDP/CP. Se añadieron 3 plantas control LR/NDP para aumentar el número de réplicas en el control no tg. Además, en vistas de que el desarrollo foliar del puente ihpCP de las plantas LR/ihpCP/CP podría condicionar la eficiencia del silenciamiento, se realizó un registro con el detalle del estado foliar de cada parte de la planta. Este detalle se incluye en la tabla 1. Todas las copas tenían follaje y ningún pie se encontraba brotado a excepción de un individuo.

grupo	puede con brotes	puede sin brotes
LR/ihpCP-10/CP	7/15	8/15
LR/ihpCP-10/CP	10/14	4/14
LR/ihpCP-15/CP	8/12	4/12
LR/ihpCP-15/NDP	5/14	9/14
LR/NDP/CP	0/2	2/2
LR/NDP/NDP	2/2	0/2
LR/NDP	0/3	3/3

Tabla 1. Desarrollo foliar de los puentes ihpCP y NDP en cada grupo de plantas. Número de individuos con puente con y sin brotes dentro de cada grupo.

Se seleccionaron 10 individuos de cada grupo para la inoculación, incluyendo las dos condiciones (puente ihpCP brotado y sin brotar). El resto de los individuos se dejó para el control sin inocular. En el caso de los controles LR/NDP/CP, uno de ellos fue inoculado y el otro se dejó como control sin inocular; y ambos controles LR/NDP/NDP se inocularon, adicionando 2 LR/NDP inoculados y 1 LR/NDP sin inocular.

La inoculación se realiza mediante transmisión del virus por injerto de material infectado. Como se muestra en la figura 1, se injertó un segmento de corteza infectada en el tallo del puente (tejido ihpCP).

Se sabe que el virus posee una distribución desigual en la planta, y por lo tanto la infectividad del inóculo por injerto de un segmento de corteza no posee la misma carga viral en todos los casos (Zanek 2007, Reyes 2009). Para evitar esta distribución desigual, el inóculo fue seleccionado cuidadosamente, y se injertaron segmentos de corteza provenientes de una misma vareta en las diferentes líneas de plantas. En todos los individuos se colocó un segmento de corteza por planta, y no se retiró durante el transcurso del ensayo. Estas condiciones de inoculación se respetaron en los siguientes ensayos de desafío.



Figura 1. Secuencia fotográfica de pasos que constituyen la inoculación del virus por injerto. Arriba a la izquierda se encuentra la planta a inocular. Luego le siguen los dos cortes en el tallo para formar una "T" desprendiendo la corteza. Abajo a la izquierda se está tomando un segmento de corteza de la rama infectada con virus (inóculo). Luego se inserta la corteza infectada en el corte en "T"; y finalmente se muestra el injerto.

La inoculación con CPsV 90-1-1 fue realizada en el puente, y al mismo tiempo las plantas fueron podadas. A medida que éstas fueron brotando se analizó la infección, mediante observación de síntomas, detección del RNA2 de CPsV por RT-PCR con *primers* A/B, cuantificación del mRNA-CP por RT-qPCR con *primers* 55i/C1, y cuantificación de la proteína CP por TAS-ELISA.

Se registró la expresión de síntomas de psorosis a los 14, 21, 28, 35, 42 y 55 días post-inoculación (dpi). La observación de síntomas en los puentes (brotados) de estas plantas en función del tiempo, se grafica en la figura 2.

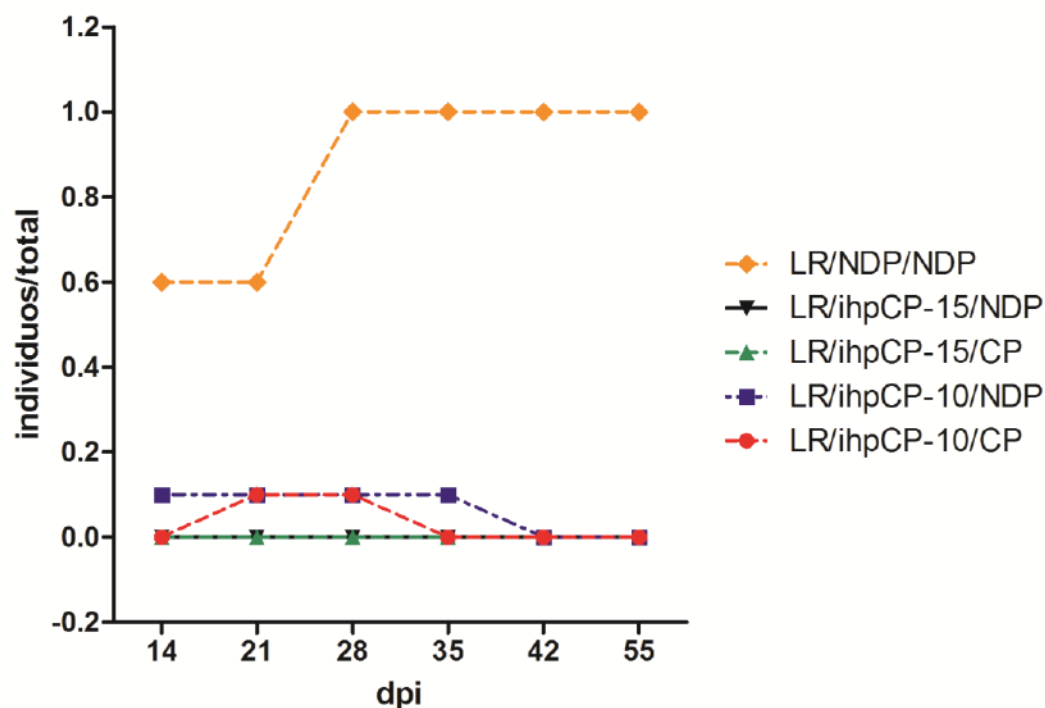


Figura 2. Observación de síntomas en el puente de las plantas indicadas, durante la primera brotación del desafío con CPsV 90-1-1. Individuos/total indica la fracción de individuos cuyo puente presentó síntomas, sobre el total de individuos en cada grupo a los 14, 21, 28, 35, 42 y 55 días post-inoculación (dpi).

Un único puente LR/ihpCP-10/NDP mostró manchas tenues desde los 14 a los 35 dpi (figura 3 a) y un puente LR/ihpCP-10/CP lo hizo desde los 21 hasta los 28 dpi (figura 3b). Al final del período de observación, ningún puente ihpCP presentó síntomas, mientras que los puentes NDP de los controles LR/NDP/NDP y los LR/NDP manifestaron manchas y *flecking*, síntomas foliares característicos de psorosis (figuras 3c y 3d), que persistieron hasta el final de la brotación.



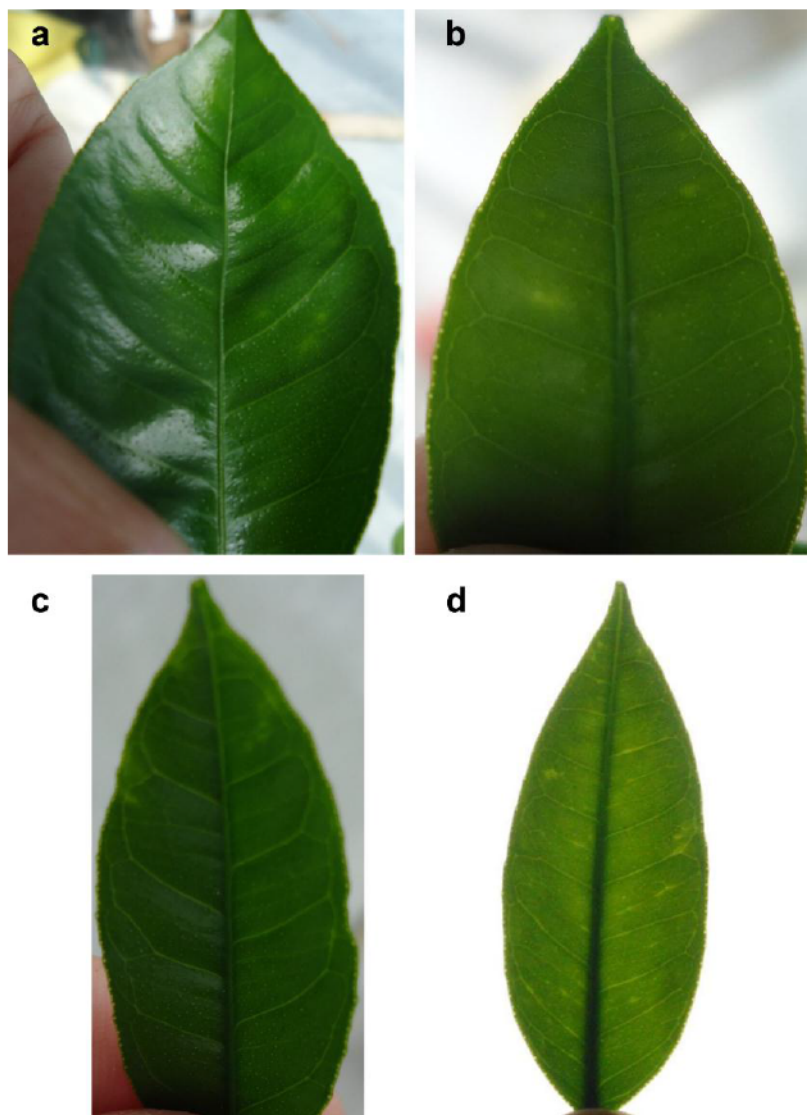


Figura 3. Síntomas observados en hojas de los puentes de los individuos de los distintos grupos durante el desafío con CPsV 90-1-1. a. LR/ihpCP-10/NDP. b. LR/ihpCP-10/CP. c: manchas cloróticas en los bordes de la hoja de un LR/NDP/NDP. d. *flecking* (fleclos cloróticos paralelos a las nervaduras) de un LR/NDP.

Se tomó material foliar de todos los puentes con brotes entre los 28 y los 42 dpi, tiempo en que las plantas se encontraban en activa brotación y aquellas hojas de los puentes ya presentaban manchas dudosas. Las muestras se analizaron por TAS-ELISA, RT-PCR y RT-qPCR para la detección de la proteína CP y los RNA virales respectivamente.

Los niveles detectados de la proteína CP de CPsV por TAS-ELISA se muestran en la figura 4.

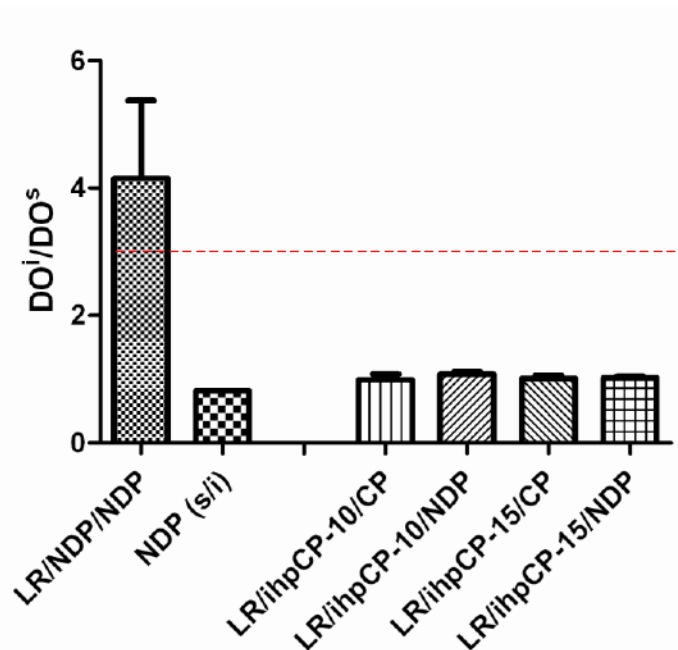


Figura 4. Detección cuantitativa de la proteína CP de CPsV por TAS-ELISA en los puentes NDP inoculados (no se indica) y el control sin inocular (s/i), y los puentes ihpCP inoculados de las plantas LR/ihpCP-10/CP, LR/ihpCP-10/NDP, LR/ihpCP-15/CP y LR/ihpCP-15/NDP.  $DO_i/DO_s$  representa el valor promedio de DO a 492 nm de los individuos de cada línea, analizados cada uno por triplicado y dividido por el promedio del control sano. La línea punteada roja indica el punto de corte ( $DO_i/DO_s=3$ ). La desviación estándar está representada por las barras superiores. El valor de DO del control negativo (NDP s/i) no se ha restado, con el objeto de mostrar los valores que arrojan las muestras negativas.

Para que un individuo sea considerado positivo en la detección de CPsV por TAS-ELISA, el cociente  $DO_i/DO_s$  debe ser mayor o igual a 3 (Alioto et al. 1999; Zaneck et al. 2006). Con ese criterio, sólo los controles LR/NDP/NDP inoculados superaron el punto de corte. La figura 4 muestra los valores promedio dentro de cada grupo. Ambos individuos LR/NDP/NDP, y los demás controles LR/NDP arrojaron valores de  $DO_i/DO_s$  por encima de 3, es decir que fueron positivos para CPsV. Por el contrario, todos los puentes ihpCP fueron negativos, con valores de  $DO_i/DO_s$  cercanos a 1, es decir, indistinguibles del control NDP sin inocular. Así, los puentes ihpCP desafiados poseen un título viral nulo según sus niveles de proteína CP.

Debido a que el RNA1 y el RNA2 de CPsV no están expuestos al silenciamiento (en el RNA3), se determinó además la presencia de CPsV a través de la detección del RNA2. Además podría ocurrir que aunque el RNA3 estuviera ausente, los demás RNA del virus fueran replicados. Esto se determinó mediante un protocolo de RT-PCR convencional con el par de cebadores A/B, que amplifican un fragmento de 270 pares de bases en el cDNA genómico viral. Los resultados coinciden con los del TAS-ELISA: los puentes NDP amplificaron el fragmento A/B, pero no lo hizo ninguno de los puentes NDP analizados individualmente, como puede verse en la figura 5.

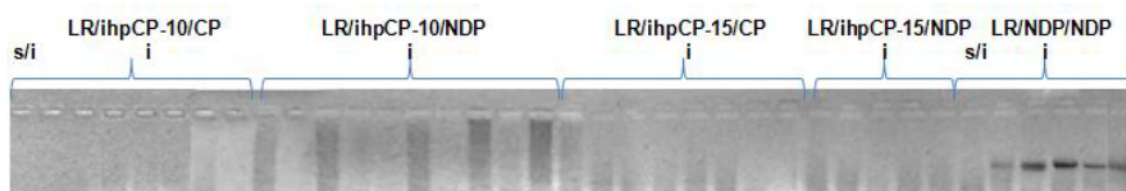


Figura 5. Análisis de los puentes ihpCP (brotados), inoculados (i) y sin inocular (s/i) dentro de cada grupo, por RT-PCR con el par de cebadores A/B en gel de agarosa 1,5%, a partir de RNA. Las bandas de los individuos del grupo LR/NDP/NDP corresponden al amplicón A/B.

Como se dijo, más allá de las ventajas de la RT-PCR A/B, la sensibilidad de este método es inferior a los de detección de RNA3. Por lo tanto, las muestras fueron analizadas como *pool* por RT-qPCR con el par de cebadores 55i/C1 que amplifican el extremo 3' del RNA3 fuera del fragmento utilizado para el transgén ihpCP, y por lo tanto la amplificación tiene lugar sólo en aquellas plantas infectadas con CPsV (figura 6).

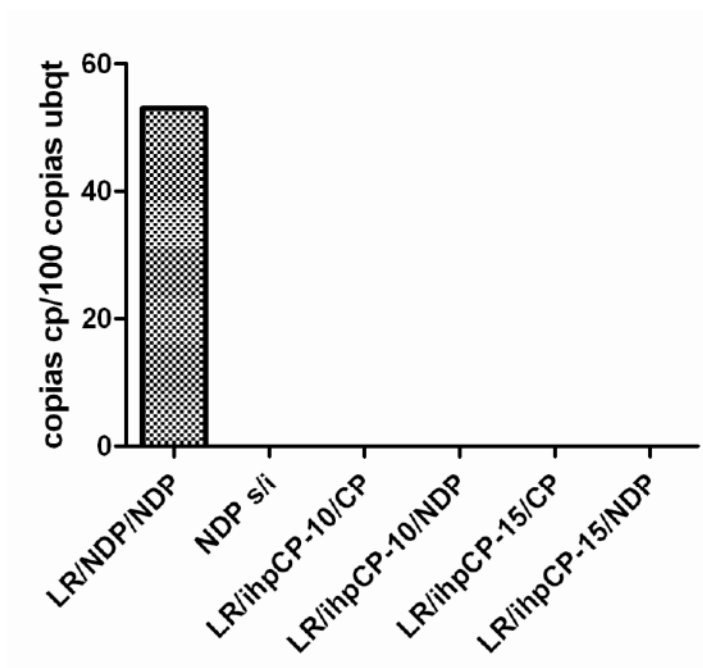


Figura 6. Detección cuantitativa del RNA3 de CPsV por RT-qPCR con *primers* 55i/C1, en los puentes NDP de las plantas LR/NDP/NDP (control no tg) inoculados y sin inocular (s/i) respectivamente, y los puentes ihpCP inoculados de las plantas LR/ihpCP-10/CP, LR/ihpCP-10/NDP, LR/ihpCP-15/CP y LR/ihpCP-15/NDP. Estos valores fueron obtenidos con una única determinación.

Solamente el grupo LR/NDP/NDP inoculado presentó amplificación en esta RT-qPCR, arrojando un valor esperable para las plantas infectadas.

Las manchas tenues observadas en 2 de los 30 puentes ihpCP brotados (de todas las combinaciones de *heterografting*), que no se observaron en ningún control sin inocular, también fueron negativas para la detección de CPsV.

Considerando que los controles NDP se infectaron, el ensayo de infección fue exitoso. Por lo tanto los puentes de las líneas ihpCP-10 y -15, son resistentes a CPsV 90-1-1 aún cuando constituyen los puentes de una planta mixta con doble *heterografting* de manera indistinta si sobre ellos fue injertada una copa NDP o una copa CP.

El material foliar de los puentes ihpCP y NDP fue colectado al final de la primera brotación, y tratado como *pool*. En ellos se analizaron los siRNAs presentes, con y sin inoculación con CPsV (figura 7).

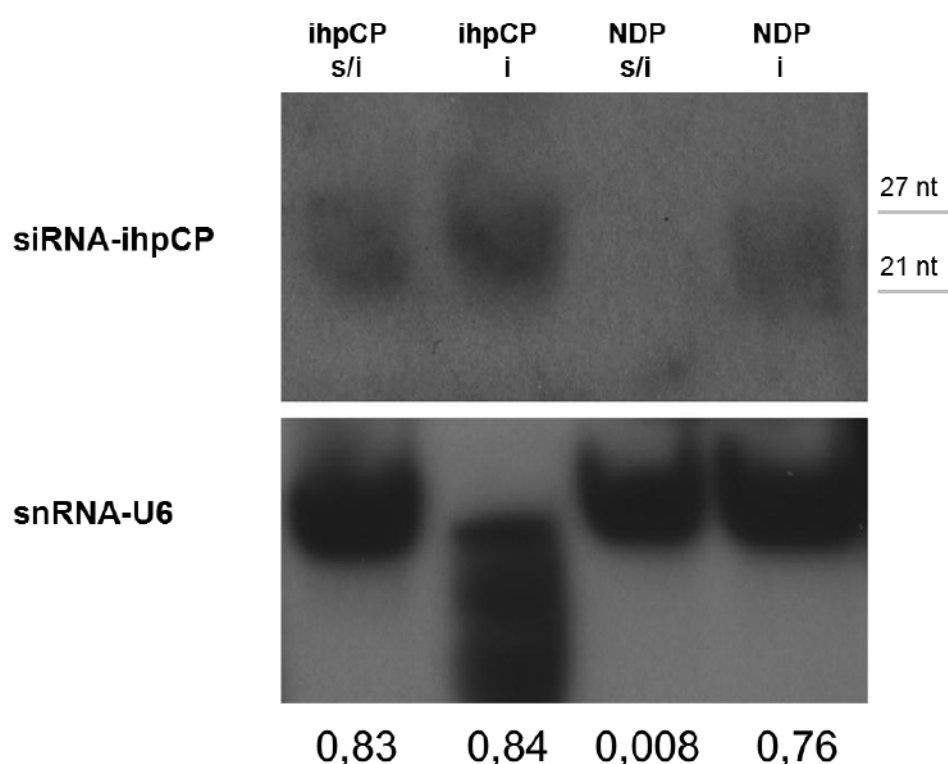


Figura 7. Acumulación de siRNA-ihpCP en puentes ihpCP-15 y NDP inoculados (i) y sin inocular (s/i) al final de la primera brotación, por Northern blot. La membrana fue hibridada con una ribosonda que porta la secuencia del gen *cp* marcada con  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP (ver Materiales y Métodos). Como marcador de peso molecular (PM) se utilizó RNA total de NDP sano mezclado con oligonucleótidos ihpCP de 21-27 nt, cuyas posiciones están indicadas en los segmentos grises de la derecha. El panel inferior muestra el control de carga mediante hibridación de la membrana con U6. Los números de abajo indican el cociente de intensidades de banda entre ihpCP y U6.

Los siRNA-ihpCP fueron detectados en las muestras correspondientes a los puentes ihpCP-15 inoculados, ihpCP-15 sin inocular y NDP inoculado, y los cocientes de intensidad de banda normalizados con U6 indican que estos tres grupos de puentes poseen niveles similares de acumulación de siRNAs. La banda difusa de U6 del puente ihpCP-15 i da cuenta de la degradación del RNA total de esa muestra, lo que no afecta a los siRNA. El *pool* ihpCP-10 fue analizado en otra membrana que aún se encuentra



en exposición y no se dispone de este resultado. Con el objeto de optimizar la determinación del tamaño de las especies de siRNA, se incluyó un marcador de peso molecular donde los oligonucleótidos de 21-27 nt se mezclaron con RNA total de NDP sano, confirmando que los siRNAs hallados poseen este rango de tamaños (figura 13).

Estos resultados coinciden con los del desafío LR/ihpCP (Reyes et al. 2011a), donde las líneas ihpCP presentaban niveles de siRNAs similares con y sin inoculación. Cabe aclarar que los siRNAs virales detectados en el control NDP inoculado, tienen secuencias correspondientes al fragmento ihpCP, cuya acumulación es del orden de las transgénicas.

#### A.2. Análisis de la resistencia frente a CPsV de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP

Una vez confirmada la resistencia de las líneas ihpCP como puente, se analizó si este comportamiento era conferido a través del injerto a las otras partes de la planta. Para ello se analizaron las copas de las plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP. Como se adelantó, todas las copas poseían follaje, de entre 1 y 6 ramas brotadas por individuo, y los pies permanecieron sin brotes, a excepción de un único pie LR del grupo LR/ihpCP-15/CP, del que brotaron dos hojas a lo largo de este ensayo. Entonces se analizó la infección con CPsV 90-1-1 en todas las copas NDP y CP, y en la única muestra de pie LR, mediante observación de síntomas, detección del RNA2 de CPsV por RT-PCR con *primers A/B*, cuantificación del RNA3 por RT-qPCR con *primers 55i/C1*, y cuantificación de la proteína CP por TAS-ELISA, a los 14, 21, 28, 35, 42 y 55 dpi.

Al igual que en los puentes, se hallaron dos patrones diferentes de sintomatología: algunas de las copas NDP y CP injertadas sobre puente ihpCP manifestaron manchas cloróticas muy tenues; mientras que las copas NDP injertadas sobre puente NDP mostraron síntomas típicos de psorosis que incluyeron *shock*, *flecking* y grandes manchas cloróticas. La copa CP del grupo LR/NDP/CP manifestó *flecking* y un patrón de manchas cloróticas abarcando toda la superficie de la hoja y en la mayoría de las hojas de las copas (en todos los casos anteriores los síntomas aparecían en unas pocas hojas de las copas). La figura 8 representa la sintomatología de cada grupo de copas.

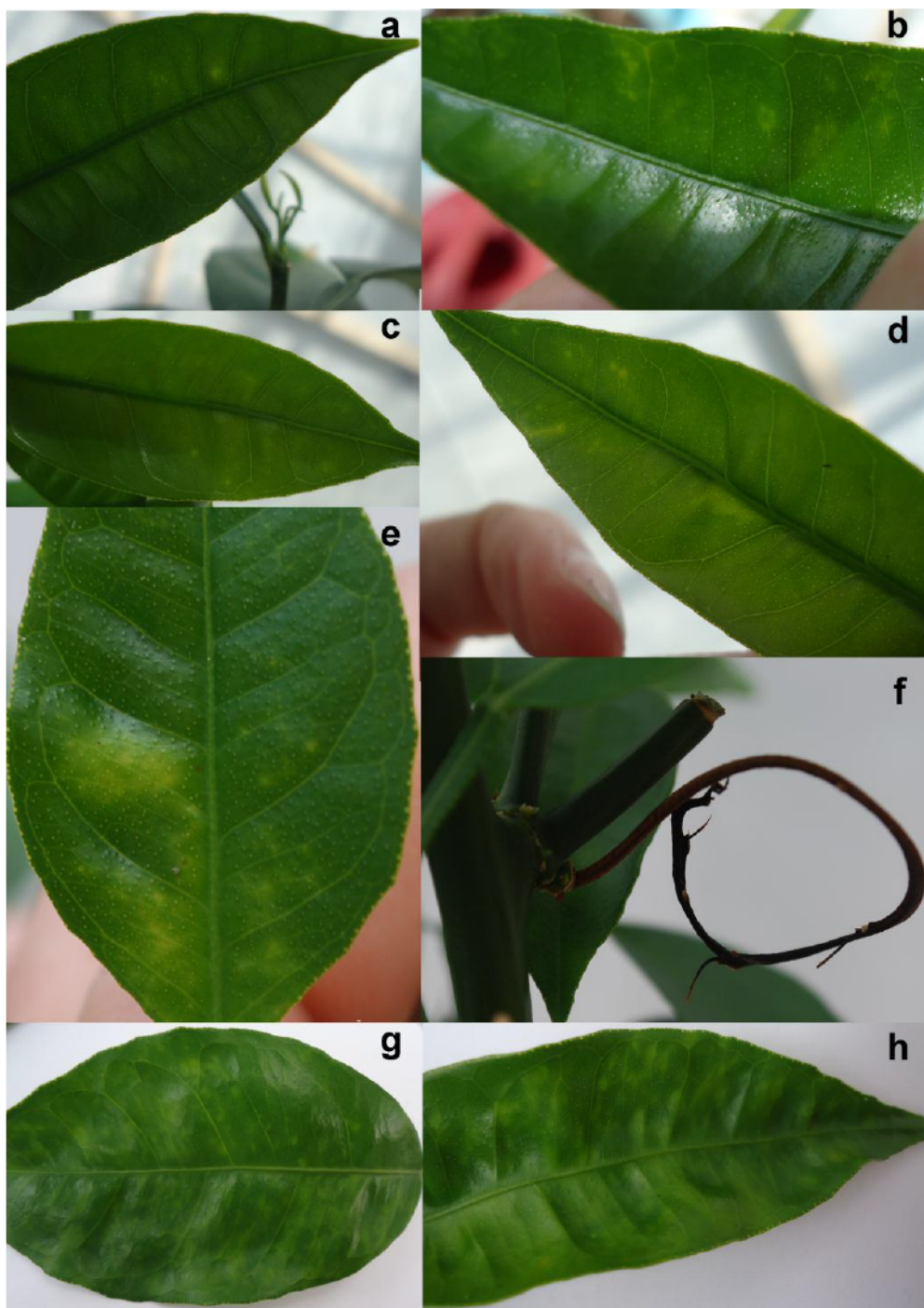


Figura 8. Síntomas en copas NDP y CP representativos de cada grupo, observados durante la primera brotación del desafío con CPsV 90-1-1. a. hoja con manchas de una copa NDP de individuo LR/ihpCP-10/NDP. b. hoja con manchas de una copa CP de individuo LR/ihpCP-10/CP. c: hoja con manchas de una copa NDP de individuo LR/ihpCP-15/NDP d. hoja con manchas de una copa CP de individuo LR/ihpCP-15/CP. e. hoja con manchas de una copa NDP de individuo LR/NDP/NDP. f. *shock* (necrosis del brote) en un individuo LR/NDP/NDP. g y h. hoja con manchas de la copa CP de un individuo LR/NDP/CP.

La figura 9 muestra el comportamiento de las copas de estas plantas en función del tiempo.

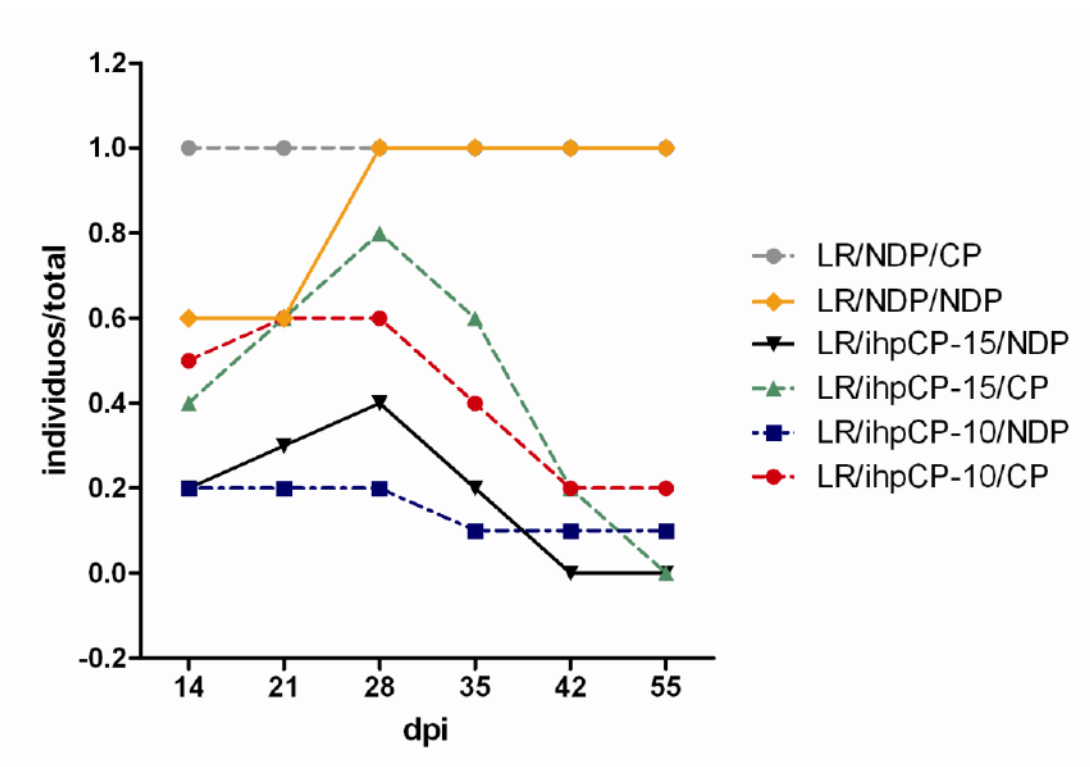


Figura 9. Observación de síntomas de psorosis en las copas durante la primera brotación después del desafío con CPsV 90-1-1. Fracción de individuos con copas CP o NDP sintomáticas sobre el total de individuos en cada grupo (individuos/total) a los 14, 21, 28, 35, 42 y 55 días post-inoculación (dpi).

Analizando la figura 9, se ve que en conjunto la proporción de copas NDP y CP sintomáticas (con manchas tenues) en los grupos de plantas con puente ihpCP alcanzó un máximo a los 28 dpi. A partir de ese tiempo, el número de plantas con síntomas visibles se redujo hacia el final de la brotación (42 y 55 dpi). En el último registro se observaron manchas muy tenues en 2 copas CP sobre ihpCP-10, y una copa NDP sobre ihpCP-10; mientras que las copas NDP y CP con puente NDP permanecieron con síntomas durante todo el período de observación. Entonces, la comparación entre los grupos de plantas por sintomatología sugiere que en las plantas con puente ihpCP existe una menor proporción de individuos sintomáticos, y con síntomas muy leves y no persistentes.

De la comparación entre los grupos surge que las copas NDP tanto en las plantas con puentes ihpCP-10 como ihpCP-15 manifestaron síntomas en una menor proporción de plantas que las copas CP con los mismos puentes.

Para tener evidencias moleculares de la presencia de CPsV en estas copas, los niveles de la proteína CP fueron medidos por TAS-ELISA.

Para éste análisis se seleccionaron hojas de cada individuo entre los 28 y los 42 dpi, incluyendo todos aquellos tejidos que desarrollaron síntomas, se extrajeron sus proteínas totales y se analizaron individualmente por TAS-ELISA (figura 10).



Si bien en Zanek et al. (2006) la línea CP tenía un nivel detectable de CP, los valores alcanzados estaban en el límite de detección. Actualmente, este nivel de proteína no se detecta, lo que podría llevar a la conclusión de que la expresión de la CP en esta línea ha disminuido; pero debe tenerse en cuenta que los sueros del TAS-ELISA fueron obtenidos hace más de 10 años, y por ende el límite de detección de este método podría ser más bajo. Sin embargo la ventaja de este método es que los niveles de proteína CP medidos provienen del virus, ya que las plantas CP sin inocular arrojan valores de TAS-ELISA similares al control no tg.

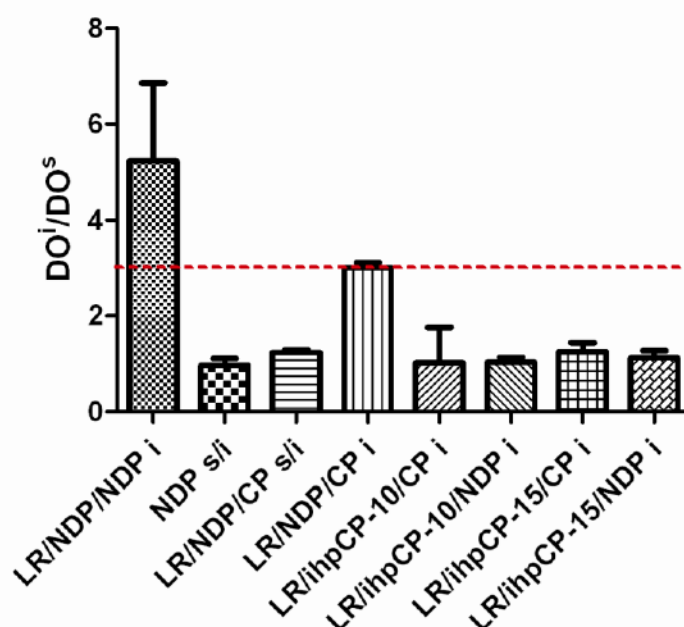


Figura 10. Detección cuantitativa de la proteína CP de CPsV por TAS-ELISA en las copas NDP y CP inoculados (i) de las plantas LR/NDP/NDP, LR/NDP/CP, LR/ihpCP-10/CP, LR/ihpCP-10/NDP, LR/ihpCP-15/CP y LR/ihpCP-15/NDP, y los controles NDP y LR/NDP/CP sin inocular (s/i). DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub> representa el valor promedio de DO a 492 nm de los individuos de cada línea, analizados cada uno por triplicado y dividido por el promedio del control sano. La línea punteada roja indica el punto de corte (DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub>=3). La desviación estándar está representada por las barras superiores.

Los títulos virales más altos por TAS-ELISA fueron alcanzados por las copas NDP del grupo LR/NDP/NDP, seguidos por la copa CP del grupo LR/NDP/CP. Estos dos grupos fueron los únicos casos en los que el promedio de los individuos (y todos los individuos por separado) superó el punto de corte. Por el contrario, todas las copas NDP o CP injertadas sobre puente ihpCP arrojaron valores de DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub> inferiores a 3, es decir que son negativos para CPsV por TAS-ELISA.

También estas copas fueron analizadas mediante la detección del RNA2 de CPsV por RT-PCR con primers A/B, y del RNA3 por RT-qPCR con primers 55i/C1. Dichas determinaciones se efectuaron entre los 28 y los 42 dpi, cuando la mayoría de las plantas manifestaban síntomas.



La RT-PCR A/B se realizó en material foliar de las copas de todos los individuos inoculados y uno sin inocular por cada grupo. Los resultados se muestran en la figura 11.



Figura 11. Análisis de las copas NDP y CP inoculadas (i) y sin inocular (s/i) dentro de cada grupo, por RT-PCR con el par de cebadores A/B en gel de agarosa 1,5%, a partir de RNA. La flecha roja indica la banda correspondiente al amplicón A/B. Calles: 1. LR/NDP s/i; 2 y 3. LR/NDP/NDP i; 4 y 5. LR/NDP i; 6. LR/NDP/CP s/i; 7. LR/NDP/CP i; 8. LR/ihpCP-10/CP s/i; 9 a 16. LR/ihpCP-10/CP i; 17. LR/ihpCP-10/NDP s/i; 18 a 25. LR/ihpCP-10/NDP i; 19. LR/ihpCP-15/CP s/i; 20 a 27. LR/ihpCP-15/CP i; 28. LR/ihpCP-15/NDP s/i; 29 a 36. LR/ihpCP-15/CP i.

Los únicos dos brotes del pie LR/ihpCP-15/CP, asintomáticos, fueron tomados y analizados por (TAS-ELISA y RT-PCR A/B), resultando negativos por ambos métodos (datos no mostrados). Este es el único dato que pudo extraerse de los pies LR en este ensayo.

Las copas NDP y CP sobre puente NDP amplificaron este fragmento, mientras que las copas de las plantas con puente ihpCP arrojaron resultados negativos.

Para confirmar este resultado con un método más sensible y cuantitativo se utilizó la técnica de RT-qPCR con *primers* 55i/C1. Cabe aclarar que la desventaja de estos *primers* en éste análisis, es que amplifican un fragmento del ORF CP en el extremo 3' del RNA3 de CPsV, es decir, que detectará tanto el RNA3 del virus, como el mRNA-CP de las copas CP. Aún así, los resultados aportaron información útil, como se explica a continuación.

Los datos de la figura 12, provienen de una única determinación, y se analizaron como *pools* de RNA total de los individuos de cada grupo mediante RT-qPCR, por consiguiente no fue posible realizar un análisis estadístico.

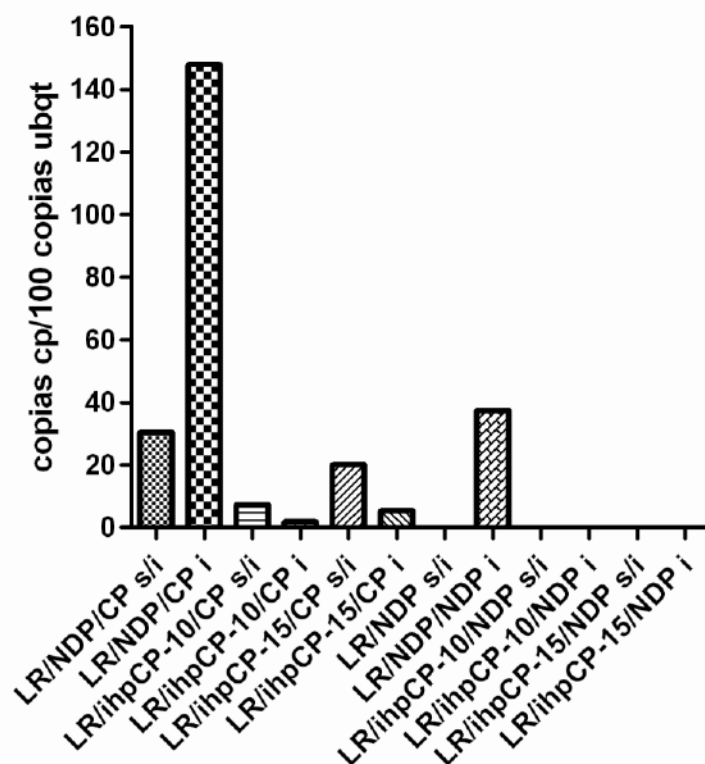


Figura 12. Detección cuantitativa del RNA3 de CPsV y/o el mRNA-CP de la copa CP por RT-qPCR con *primers* 55i/C1 en las copas inoculadas (i) y sin inocular (s/i).

Los resultados muestran que las copas CP de las plantas LR/NDP/CP inoculadas alcanzaron la mayor acumulación del amplicón 55i/C1, seguidas de la copa NDP de LR/NDP/NDP inoculada. Es decir que ambos controles con puente NDP se infectaron con CPsV, coincidiendo con los resultados del TAS-ELISA, de la RT-PCR que detecta el RNA2, y la manifestación de síntomas.

En cambio, las copas NDP injertadas sobre puentes ihpCP-10 y -15 e inoculadas con CPsV, no presentaron amplificación. Ello indica que en las copas NDP sobre ihpCP no hubo multiplicación viral.

En las copas CP la amplificación proviene del transgén-CP y/o del RNA3 de CPsV, tanto genómicos como el transcripto, si hubiera multiplicación viral. Se muestra que las copas CP sobre el puente no tg inoculados presentaron un número de amplicones mas alto que la misma copa sobre puente sin inocular, sugiriendo que se trata de la sumatoria de la expresión del transgén y la multiplicación viral.

Al analizar las copas CP sobre puentes ihpCP se halló el resultado inverso, esto es: las copas CP sobre puentes inoculados presentaron un número de amplicones menor que las mismas sobre puentes sin inocular. Una interpretación posible es que si bien el virus no alcanza una multiplicación suficiente como para producir una invasión, lo sea para aportar más moléculas *target* (RNA3 viral), induciendo mayor degradación de este RNA, conjuntamente con el derivado del transgén. Este comportamiento se observa en las copas CP de los puentes de ambas líneas ihpCP.

Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que las líneas ihpCP-10 y 15 resisten a CPsV cuando se encuentran como puente, tanto de plantas LR/ihpCP/CP como LR/ihpCP/NDP, es decir, tengan como copa a NDP como la línea CP.

Además, se analizó la presencia de siRNAs en estas plantas por Northern blot, también como *pool* de cada grupo. Los resultados obtenidos con la línea ihpCP-15 se muestran en la figura 13, mientras que el blot de la línea ihpCP-10 está aún en exposición.

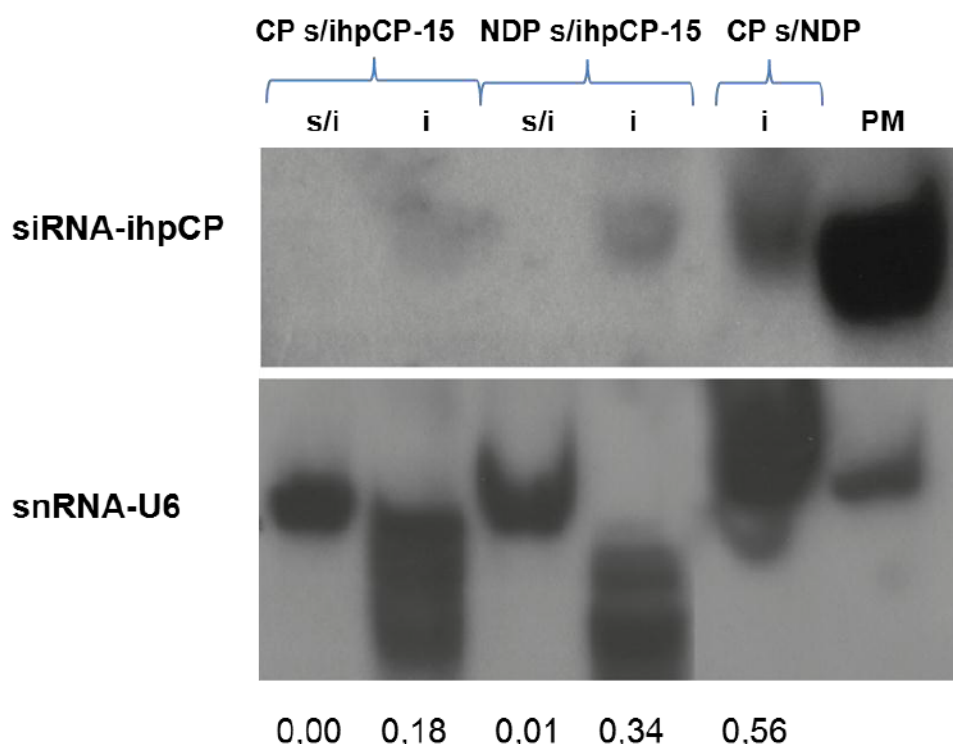


Figura 13. Acumulación de siRNA-ihpCP al final de la primera brotación, en copas CP sobre puente ihpCP-15 sin inocular (s/i) e inoculadas (i), copas NDP sobre ihpCP-15 s/i e i, y copa CP sobre NDP i, por Northern blot. La membrana fue hibridada con una ribosonda que porta la secuencia del gen *cp* marcada con  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP. El marcador de peso molecular (PM) fue RNA total de NDP sano mezclado con oligonucleótidos de 21 y 27 nt que presentan homología con la sonda, y por lo tanto aparece una banda intensa. El panel inferior muestra el control de carga mediante hibridación de la membrana con U6. Los números de abajo indican el cociente de intensidades de banda entre ihpCP y U6.

Fueron detectados siRNA-ihpCP en las copas CP y NDP sobre puente ihpCP-15 inoculado, y en la copa CP sobre puente NDP inoculado. Las respectivas copas sobre ihpCP-15 sin inocular no acumularon siRNA-ihpCP. Analizando las intensidades relativas normalizadas con U6, se ve que la copa CP sobre NDP posee la mayor concentración de siRNAs. Comparando los dos grupos de copas sobre puente ihpCP-15 se ve que la acumulación de siRNAs en la copa NDP es mayor que en la copa CP. Ambas muestras presentan una banda difusa en la hibridación con U6, probablemente producto de la degradación del RNA total.

En el capítulo 2 se había encontrado que las copas CP sobre puentes ihpCP presentaban, cierto nivel de siRNA, que concomitantemente con la disminución del mRNA-CP indicaba que había silenciamiento de ese gen. Sin embargo, la detección se encontraba en el límite. En este blot, no se llega a detectar siRNA derivados del mRNA-CP sobre el puente ihpCP-15 sin inocular, lo que podría deberse a que se encuentran bajo ese límite.

Estos resultados se correlacionaron con un título viral indetectable en las copas CP y NDP sobre ihpCP-15, sugiriendo que no hay infección en estas plantas, y una detección de CPsV en la copa CP sobre NDP determinados por TAS-ELISA, RT-PCR del RNA 2, y RT-qPCR del RNA 3, que confirman la infección de la misma. Nuevamente, la interpretación posible es que si bien el virus no alcanza una multiplicación suficiente como para ser detectado, aporte más moléculas target (RNA3 viral), induciendo mayor degradación de este RNA, conjuntamente con el derivado del transgén, detectándose siRNAs productos del silenciamiento de éste. Resta corroborar que la disminución del nivel de mRNA-CP de la copa CP sobre puente ihpCP-15 con el aumento de los siRNA-ihpCP en esos tejidos, se presente también en la planta con puente ihpCP-10.

Considerando el conjunto de los resultados, se ve que no existen diferencias significativas entre el comportamiento de los puentes de las plantas con copas NDP o CP, ya que ambas son resistentes a la infección. Sin embargo, en cuanto a la manifestación de síntomas, las plantas LR/ihpCP/NDP superarían a las plantas LR/ihpCP/CP, en la atenuación de los mismos, tanto con la línea ihpCP-10 como con la -15. Una posible explicación es que la resistencia está mediada por el mecanismo de silenciamiento génico del RNA3 en una etapa inicial del ciclo viral, impidiendo que el virus supere cierto nivel de multiplicación. Finalmente, vemos entonces, que la copa no transgénica de NDP resiste la infección viral cuando se encuentra sobre el puente ihpCP-15, cuando la entrada del virus ocurre en el puente resistente, apoyando la hipótesis planteada. La copa CP, sin embargo no aportaría una diferencia en la resistencia frente al virus respecto de la copa no transgénica, refutando la hipótesis de que la presencia del target en la copa conferiría mayor resistencia a la planta, que la copa NDP.

Resta mencionar en esta sección, que en este ensayo brotó un único pie de una planta LR/ihpCP-15/CP, que resultó asintomático, y al analizarse por RT-PCR A/B fue negativo para CPsV.

## **B. Determinación de la estabilidad de la resistencia de las plantas LR/ihpCP frente a CPsV**

Uno de los interrogantes que surgieron después del desafío de las plantas LR/ihpCP (Reyes, 2009) era si realmente la resistencia que presentaban esas plantas era debida a una “inmunidad”, dada por una inhibición total de la multiplicación viral, o si el método de detección del virus no alcanzaba a determinar una carga viral tan baja, que además no manifestara síntomas. Otro interrogante, era acerca del pie LR de estas plantas, que es no tg y susceptible a CPsV. Como la inoculación es por injerto, en la copa ihpCP, podía ser probable que el virus viajara hacia el pie no tg, y allí se multiplicara, es decir, que el pie podría actuar como una fuente continua de virus y por ende un desafío



constante de la planta ihpCP, cuya resistencia podría ser sobrepasada en cualquier momento. Debido a que los pies son una parte de la planta difícil de brotar, no se obtuvo material de esa parte de la planta en las primeras brotaciones, por lo que no pudieron ser analizados.

Las plantas de este ensayo fueron mantenidas en el invernadero de la EEA-INTA Concordia durante 2 años. En ese tiempo, las plantas fueron asintomáticas, y después de ese tiempo fueron analizadas molecularmente, y utilizadas para el ensayo que se expondrá en esta sección.

Para determinar la estabilidad de la resistencia en estas plantas, además del análisis molecular se planteó la siguiente hipótesis. El virus podría estar latente, es decir, por debajo del nivel de detección, pero presente en tejidos del puente ihpCP, como también en el pie LR susceptible. En este sistema, una forma de multiplicar el virus que estuviera latente, es injertando una yema o vareta de NDP (heterografting) en la copa ihpCP y determinando la presencia del virus en esa nueva copa susceptible. Es decir, este ensayo permitiría observar si hubiera virus latente en el pie o el puente, que se movilizarían hacia la copa no tg, y allí multiplicarse, evidenciando su presencia.

La figura 14 muestra un esquema del experimento desde los ensayos realizados por Reyes (2009) en adelante, incluyendo el *heterografting* realizado en este trabajo de tesis.

Se contó con 8 individuos LR/ihpCP-10 y 9 individuos LR/ihpCP-15 desafiados por Reyes (2009), y se incluyeron 10 individuos LR/NDP (control no tg) desafiados con CPsV 90-1-1, el virus homólogo al transgén. A la mitad de estas plantas se les injertó una copa NDP, y a la otra mitad una copa CP (que se analizarán en el siguiente apartado). Además, algunos de los pies pudieron brotar, por lo que hubo material foliar de esta parte de la planta

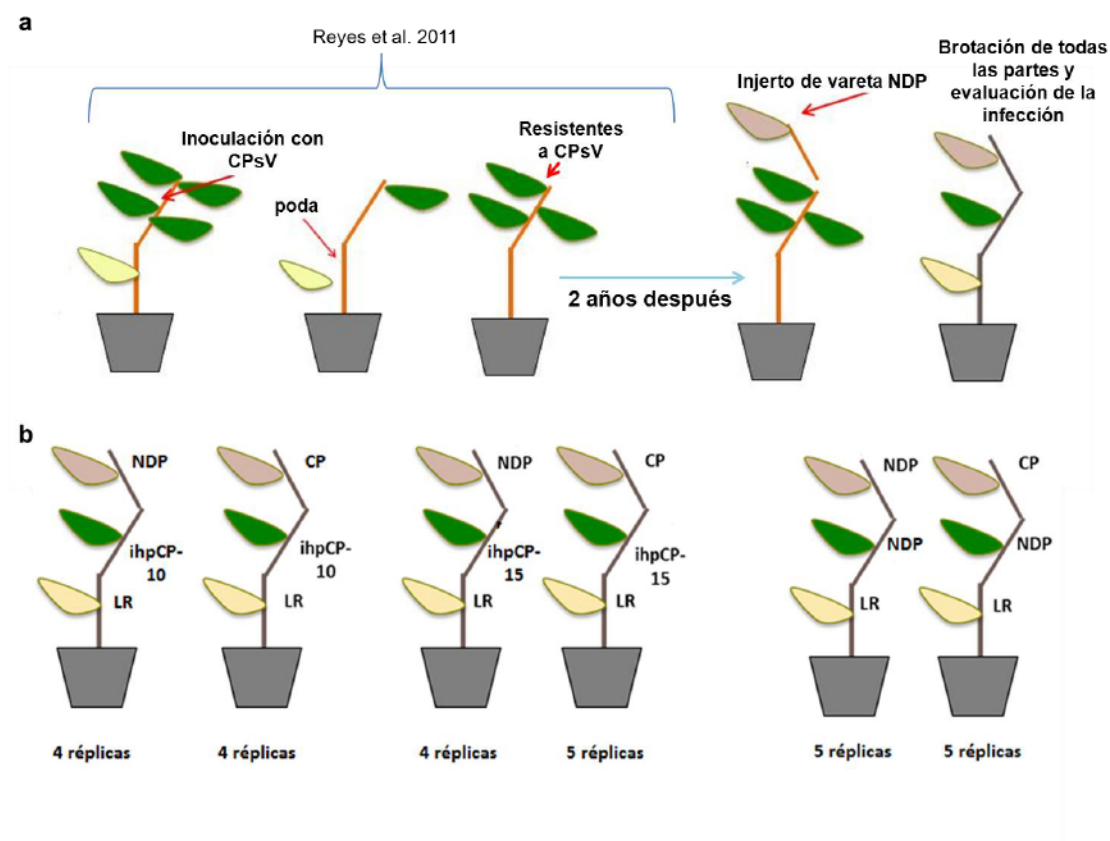


Figura 14. a. Esquema del experimento realizado por Reyes (2009) y posterior *heterografting* para obtener las plantas LR/ihpCP/NDP infectadas previamente. b. Número de individuos incluidos en cada grupo de doble *heterografting*.

Con el objeto de obtener un desarrollo acelerado de estas copas, se injertaron varetas en lugar de yemas. El tiempo demandado para que la copa alcance un tamaño apto para el análisis fue 6 meses, es decir mitad del tiempo requerido al partir de yemas (12-14 meses).

Una vez que se encontraron brotadas las tres partes del doble *heterografting* en la mayoría de los individuos (algunos puentes y pies no brotaron), se extrajo material foliar de pie, puente y copa, y se analizó en ellas la presencia del virus por TAS-ELISA y RT-PCR con *primers* A/B, y observación de síntomas. Cabe aclarar que no se re-inoculó, sino que se determinó la presencia del virus en esas plantas inoculadas 2 años atrás.

Los resultados se detallan en la tabla 3, donde coincidieron las determinaciones por TAS-ELISA y RT-PCR.

		TAS-ELISA/RT-PCR (+)	Síntomas
LR/ihpCP-10/NDP	Pie	3/3	0/3
	Puente	2/4	2/4
	Copa	4/4	3/4
LR/ihpCP-15/NDP	Pie	1/3	0/3
	Puente	0/3	0/3
	Copa	2/4	0/4
LR/NDP/NDP	Pie	4/5	1/5
	Puente	2/2	1/2
	Copa	4/5	1/5

Tabla 3. Análisis de la infección con CPsV 90-1-1 previa al doble *heterografting*, en plantas LR/ihpCP/NDP y el control LR/NDP/NDP. Se indica la fracción de individuos con diagnóstico de CPsV positivo por TAS-ELISA y RT-PCR y la fracción de individuos con síntomas característicos de psorosis (*flecking*, manchas, *shock*) dentro de cada grupo. El denominador de la fracción expresa el número de individuos que se encontraban brotados y de los que se colectó material foliar.

La mitad de los puentes ihpCP-10 (2/4), y todas las copas NDP y los pies LR de las plantas LR/ihpCP-10/NDP estaban infectadas con CPsV, además de que la mayoría de ellas manifestó síntomas de psorosis. Si bien los síntomas no se habían evidenciado previamente, es probable que la poda forzada por el *heterografting* haya estimulado la multiplicación viral (hecho observado previamente en plantas no transgénicas, y en plantas de campo en época de brotación foliar). Es decir que la resistencia manifestada en las primeras brotaciones post-inoculación fue quebrada en algunos individuos de esa línea, 2 años después.

En el caso de la planta LR/ihpCP-15/NDP, los resultados fueron diferentes. Los puentes no fueron sintomáticos, y el virus no fue detectado, indicando la estabilidad de la resistencia de esta línea. Aún mas, sólo 1/3 pies y 2/4 copas NDP resultaron positivas, mientras que no se observaron síntomas en ninguno de ellos. Esto evidencia que el virus estaba latente, en el pie o en el puente, pero que en ésta línea, la resistencia, aunque no absoluta, es estable y suficiente para evitar los síntomas de la enfermedad, al menos en plantines de invernáculo.

En los controles no tg, con puente NDP, se halló infección en 4 de las 5 plantas inoculadas.

Para desafiar aún más la resistencia de la línea ihpCP-15, se re-inocularon estas plantas, y si bien se infectó un pie más que había permanecido sin infección antes de la

re-inoculación, en ningún puente ihpCP-15 se detectó CPsV. A pesar de que el número de réplicas por grupo es bajo, la tendencia es que la línea ihpCP-15 conservaría la resistencia varios años después de la determinación de Reyes (2009).

### **C. Determinación del grado de resistencia de las copas NDP y CP en plantas LR/ihpCP/NDP y LR/ihpCP/CP frente a CPsV con inoculación previa al *heterografting***

Como ha sido planteado previamente, el interrogante de una copa transgénica o no transgénica sobre un puente resistente, sigue siendo importante de ensayar en plantas que permanecieron 2 años con el virus latente, y hubo diferencias entre la línea ihpCP-10 y -15. Por otro lado, otro interrogantes para el manejo de plantas a campo, que se supieran naturalmente infectadas por CPsV en el puente resistente, es determinar el virus pudiera multiplicarse una nueva copa injertada sobre éste. Para esto se tomaron la mitad de los individuos de los grupos que se muestran en la figura 13b, que insuficiente para analizar estadísticamente los resultados, fueron útiles como experimento preliminar. En estos ensayos se procedió al injerto de varetas mientras que los ensayos descritos en el apartado A, se utilizaron yemas, condición que se discutirá también en esta sección.

Una vez que se encontraron brotadas las tres partes del doble *heterografting* en la mayoría de los individuos se extrajo material foliar de pie, puente y copa, y se analizó en ellas la presencia del virus por TAS-ELISA y RT-PCR con primers A/B, y observación de síntomas. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Analizando en conjunto la infección en los pies LR (de las tablas 3 y 4), se ve que el virus se detectó en la totalidad de los pies de los individuos con puente ihpCP-10 (8/8), y en 9/10 individuos controles con puente NDP; mientras que los pies de las plantas con puente ihpCP-15 se infectaron en un tercio de los casos (2/6). Nuevamente las plantas con puente ihpCP-15 son las que presentaron menor cantidad de escape de virus hacia el pie.

Analizando en conjunto la infección en los pies LR (de las tablas 3 y 4), se ve que el virus se detectó en la totalidad de los pies de los individuos con puente ihpCP-10 (8/8), y en 9/10 individuos controles con puente NDP; mientras que los pies de las plantas con puente ihpCP-15 se infectaron en un tercio de los casos (2/6). Nuevamente las plantas con puente ihpCP-15 son las que mejor protegen el pie en la infección viral.



		TAS-ELISA/RT-PCR (+)	síntomas
LR/ihpCP-10/CP	Pie	3/3	0/3
	Puente	1/2	0/2
	Copa CP	2/4	1/4
LR/ihpCP-15/CP	pie	1/3	1/3
	puente	0/0	0/0
	Copa	3/5	2/5
LR/NDP/CP	Pie	5/5	0/5
	Puente	3/4	1/4
	Copa	4/4	1/4

Tabla 4. Análisis de la infección con CPsV 90-1-1 previa al doble *heterografting*, en plantas LR/ihpCP/CP y el control LR/NDP/CP. Se indica la fracción de individuos con diagnóstico de CPsV positivo por TAS-ELISA y RT-PCR y la fracción de individuos con síntomas característicos de psorosis (*flecking*, manchas, *shock*) dentro de cada grupo. El denominador de la fracción expresa el número de individuos que se encontraban brotados y de los que se colectó material foliar.

Como muestra la tabla 4, se infectaron 2/4 copas CP sobre el puente ihpCP-10 y 3/5 sobre el puente ihpCP-15, mientras que los controles lo hicieron en su totalidad (4/4). Es decir que no se encontraron diferencias marcadas entre estas dos líneas ihpCP en cuanto a la movilización del virus hacia la copa CP.

En general se puede decir que el comportamiento global de las copas NDP y CP sobre puentes ihpCP-10 y -15 no presentan diferencias marcadas, aunque esto debería confirmarse en un experimento con mayor cantidad de individuos.

Al analizar la correlación entre la sintomatología y la detección de CPsV, se ve que hay un número menor de individuos sintomáticos que fueron positivos para CPsV por TAS-ELISA y RT-PCR A/B. Es decir que existen casos de muestras asintomáticas con detección de CPsV, pero no se da el caso de muestras con síntomas y negativas para CPsV. Ello indicaría que la sintomatología no es específica de la infección con psorosis, y que es necesario recurrir a métodos moleculares de detección de CPsV.

## CONCLUSIONES

- Las líneas ihpCP-10 y -15, utilizadas como puentes en una planta con doble *heterografting*, no fueron infectadas por CPsV 90-1-1, como fue determinado por observación de síntomas, TAS-ELISA de la proteína CP, RT-PCR del RNA2 y RT-qPCR del RNA3. Es decir que estas líneas ihpCP son resistentes a este virus, aún siendo puentes.
- Cuando las líneas ihpCP-10 y -15 están como puentes en plantas con doble *heterografting*, la resistencia fue similar con copa NDP o copa CP.
- Las copas NDP y CP injertadas sobre los puentes ihpCP y desafiadas en los puentes ihpCP-10 y -15, presentaron carga viral nula de acuerdo a los métodos de TAS-ELISA y RT-PCR, en la primera brotación.
- Se registró un descenso en los niveles de mRNA-CP en las copas CP sobre los puentes ihpCP-10 y -15 inoculados, y hubo acumulación de siRNA en las copas NDP y CP sobre puente ihpCP-15 inoculado.
- La resistencia de las líneas ihpCP-10 y -15 no es completa, dado que el virus pudo movilizarse hacia el pie y hacia la copa, 2 años después de ser inoculado, indicando que CPsV estaba latente en esas plantas y el *heterografting* disparó su multiplicación.
- La resistencia línea ihpCP-15 fue estable a los dos años después de su desafío, con un nuevo *heterografting* y aún con una re-inoculación; mientras que la línea ihpCP-10 mostró quiebre parcial de la resistencia en los puentes.
- Las copas NDP y CP se infectaron indistintamente cuando el *heterografting* fue posterior a la inoculación con CPsV.

## DISCUSIÓN

En este capítulo se amplió el conocimiento acerca de la resistencia de las plantas ihpCP frente a CPsV.

En los ensayos de desafío realizados en invernáculo hay que tener en cuenta la variabilidad dada por el estado fisiológico y el desarrollo de follaje de cada individuo, además de las variables propias del inóculo y la dificultad para normalizar la carga viral. Cabe aclarar que las condiciones de infección utilizadas (un segmento de corteza infectada con CPsV 90-1-1, injertada durante todo el desafío), a pesar de no poder

precisar la cifra, se sabe que poseen una carga viral mucho mayor a la que recibirían en una infección natural, es decir que se están ensayando condiciones de infección mucho más extremas a las que podrían presentarse en el campo.

Además, los resultados de estos desafíos no brindan información completa para los ensayos a campos, ya que en condiciones naturales la infección podría producirse en cualquiera de las partes del árbol. Ya que el vector transmisor de psorosis aún no fue confirmado, deberían ensayarse las 3 partes de la planta (el vector podría ser alado e infectar la copa, o de suelo e infectar el pie).

En relación a las hipótesis planteadas al comienzo del capítulo, el conjunto de estos resultados apoya la hipótesis de que el *heterografting* y el desarrollo foliar no afectan la resistencia de los tejidos ihpCP frente a CPsV cuando éstos son puentes, ya que estas líneas fueron resistentes como puentes; y también le confirieron resistencia a las copas, fueran éstas CP o NDP.

Algunos individuos con puente ihpCP manifestaron síntomas leves que no son los característicos de psorosis, y que luego desaparecieron en la mayoría de los casos. Este hecho puede describirse como una recuperación (*recovery*) en la que la atenuación/desaparición de los síntomas, se correlaciona con la degradación del mRNA-CP en las copas CP y la acumulación de siRNAs en copas NDP y CP sobre puente ihpCP-15. O sea que el virus ingresaría a los tejidos del puente y de la copa, iniciaría allí su multiplicación, pero al ser degradado por silenciamiento génico, se bloquearía la infección.

También las copas NDP y CP injertadas sobre puente ihpCP fueron resistentes a CPsV. Este hecho sugiere que el silenciamiento causante de esa resistencia pudo ser transmitido a través del injerto hacia tejidos antes susceptibles a CPsV. Ello reviste importancia biotecnológica, ya que podrían generarse plantas con pie ihpCP y copa no tg, y la planta completa sería resistente, pero las copas productoras de los frutos comercializables serían no tg. Existe controversia acerca del transporte de siRNAs en los OMGs, pero en principio el hecho de que la copa sea no tg aporta un nivel de bioseguridad al alimento (Petri and Burgos 2005; Craig et al. 2008; Haroldsen et al. 2012; Lemgo et al. 2013).

En el capítulo 2 se encontraron diferencias entre las copas NDP y CP (sin inocular) en cuanto a la acumulación de siRNAs, ya que sólo se hallaron siRNAs en las copas CP. En base a ello se hipotetizó que las plantas con copa CP estarían más preparadas frente al ataque del virus, pero esta hipótesis es rechazada, ya que no se vieron diferencias entre la resistencia de las copas CP con respecto a las NDP sobre puente ihpCP, es decir que la acumulación de siRNA observada en las copas CP sin inocular, y la confirmación del establecimiento de silenciamiento es éstas por la degradación de su target, no representaron una ventaja por sobre las copas NDP frente al virus. Al contrario, las plantas LR/ihpCP/CP mostraron síntomas leves luego de la inoculación en una proporción de individuos más alta que el grupo LR/ihpCP/NDP.

En el ensayo en que la inoculación con CPsV fue previa al doble *heterografting* se encontró que luego de dos años algunos puentes ihpCP-10 quebraron la resistencia, mientras que la línea ihpCP-15 mantuvo la resistencia de sus puentes en todos los individuos analizados. Ello sugiere que la línea ihpCP-15 presenta una mayor resistencia

frente al virus. También se probó en este ensayo que las plantas ihpCP no eran inmunes sino sólo resistentes, ya que el virus, que se encontraba latente en los tejidos susceptibles, logró transportarse luego de la generación del *heterografting* y multiplicarse en tejidos susceptibles.

Comparando con los resultados de los apartados B y C (inoculación anterior al *heterografting*), con los del apartado A (inoculación posterior al *heterografting*) en el que todas las plantas con puente ihpCP fueron resistentes a la infección con CPsV 90-1-1, puede inferirse que para que la resistencia a través del doble *heterografting* sea eficiente, es necesario que éste preceda a la aparición del virus. Este hecho es fundamental en la proyección de ensayos a campo, ya que si se cambiaran las copas en el campo utilizando un puente ihpCP buscando conferir resistencia al árbol, esto no podría ocurrir si el árbol ya está infectado con CPsV.

Un aspecto a destacar con respecto a la generación del *heterografting* antes y después de la inoculación con CPsV, es que el de la parte B fue realizado mediante injerto de yemas y el de la parte C mediante injerto de varetas. Esto puede constituir una diferencia importante a la hora de evaluar la transmisión del silenciamiento, ya que cuando se injerta una yema, este tejido es muy joven y actúa como sumidero de la señal de silenciamiento (Tournier et al. 2006), pudiendo establecer dicho mecanismo durante su desarrollo. Por el contrario, la vareta es una rama con sus tejidos muy diferenciados y es probable que aunque llegue la señal, el silenciamiento no logre establecerse. Así podría explicarse el hecho de que la transmisión del silenciamiento ocurrió con éxito en el primer caso pero no en el segundo. Ello más que una respuesta, aporta nuevos interrogantes sobre las diferencias existentes entre el injerto de yema y de vareta.

## PERPECTIVAS

- En vistas de que el vector aún no está confirmado, y podría ser alado, o de suelo; éste sería capaz de tomar contacto con la copa o el pie, donde transmitiría el virus. Por lo tanto, sería interesante determinar la resistencia de las plantas con doble *heterografting* cuando se inoculan en la copas NDP, o en el pie LR.
- Generar pies ihpCP para su evaluación a campo. Para ello es necesario optimizar el enraizamiento de las líneas transgénicas, ya que hasta ahora sólo se propagan como copas.





## Capítulo 4

### **Desafío de las líneas ihpCP-10 y -15 con un aislamiento heterólogo de psorosis B**

- A. Ensayo de infección de las líneas ihpCP con el aislamiento heterólogo de PsB, aislamiento CPsV 189-34
- B. Análisis de la resistencia de las líneas ihpCP-10 y -15 frente a CPsV 189-34





## INTRODUCCIÓN

Se han descrito dos síndromes diferentes de psorosis en el campo, denominados A y B. La más común, psorosis A (PsA), presenta un descortezado que sólo afecta al tronco y ramas principales (figura 1a), mientras que el más agresivo, psorosis B (PsB), muestra lesiones en la corteza e incluso a ramas delgadas, con desprendimiento de corteza (figura 1b, c) y con erupción de goma y pústulas en ramas jóvenes (figura 1i). Las hojas viejas muestran grandes manchas cloróticas irregulares en el lado superior (figura 1d-h), necrosis, y erupciones parduzcas de goma impregnando la parte inferior de la hoja (figura 1g) (Fawcett and Klotz 1938).

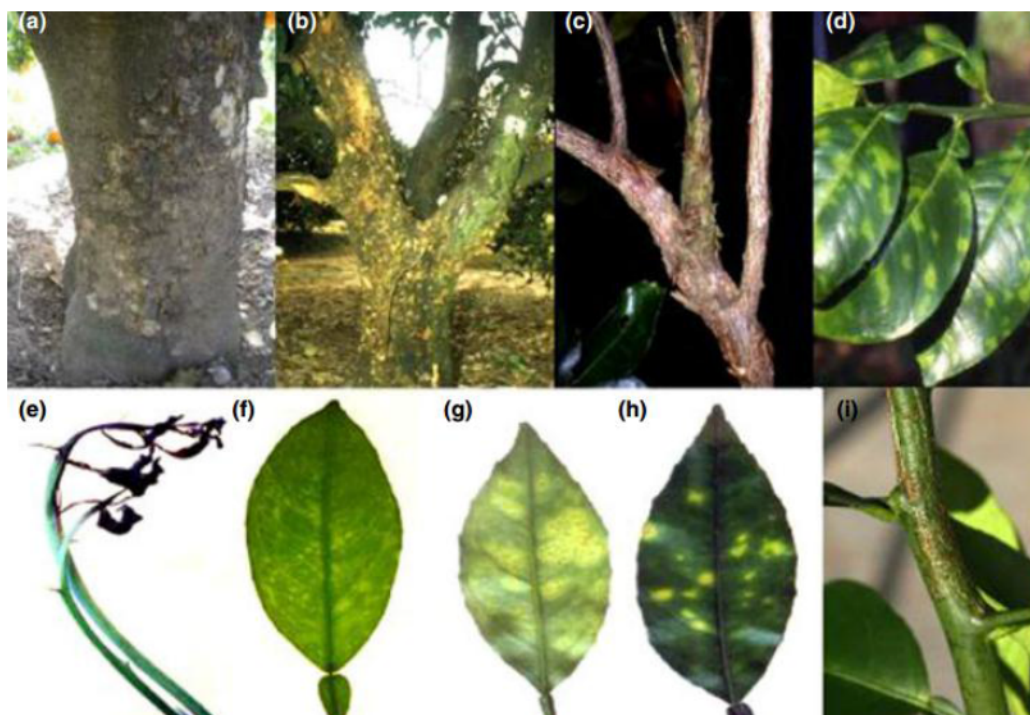


Figura 1. Síntomas característicos de los síndromes psorosis A (PsA) y psorosis B (PsB) en árboles de campo (a-d) o en plantas indicadoras de invernáculo (e-i). (Tomado de Velázquez et al. 2012). Síntomas de PsA: a. descascarado del tronco de los árboles del campo. e. reacción de shock en hoja en la primera brotación. f. flecking y manchas cloróticas en la primera brotación y en las brotaciones posteriores en plantas indicadoras de Naranja Dulce. Síntomas de PsB. b, c. descascarado más grave de la corteza, afectando incluso ramas delgadas. d. Clorosis en hojas viejas. h. manchas cloróticas en las hojas viejas. g. pústulas gomosas en la parte inferior de la hoja. i. ampollas y pústulas en ramas.

En plantas indicadoras de invernáculo, la mayoría de los aislamientos de psorosis inducen una reacción de shock, las hojas se doblan y dan necrosis además de *flecking* y manchas en la primera brotación (figura 1e), y sólo flecos cloróticos (*flecking*) y manchas en las hojas jóvenes en las siguientes brotaciones. Otros aislamientos sólo inducen *flecking* y manchas, sin shock (figura 1f). Los aislamientos de PsB además, manifiestan manchado clorótico en las hojas viejas con pústulas gomosas en la parte inferior de la hoja (figura 1g, h), similar a los síntomas observados en árboles en el campo, y ampollas en el tallo y las ramas (figura 1i) que suelen evolucionar para producir



necrosis en ramas más jóvenes (Roistacher 1991; 1993). El síndrome PsB también puede ser inducido en plantas indicadoras utilizando un pequeño trozo de corteza de un área con lesiones de un árbol que haya sido infectado con PsA (Fawcett and Cochran 1942), lo que sugiere que los árboles que muestran los síntomas de psorosis pueden contener ambos componentes o variantes de CPsV responsables de ambos síndromes. Por otra parte, plantas indicadoras infectadas con PsA muestran protección contra la inoculación de PsB, ya que no desarrollan pústulas o ampollas en hoja y ramas pequeñas, que son característicos de PsB (Wallace 1957; Roistacher 1991; 1993), lo que sugiere que existiría una protección cruzada entre las cepas del mismo virus (Folimonova et al. 2010). Debido a que otros patógenos transmisibles por injerto manifiestan síntomas en las hojas jóvenes similares a los de psorosis, esta prueba de protección cruzada se ha utilizado durante años para el diagnóstico específico de psorosis (Martín et al. 2004).

Mediante estudios moleculares, Velázquez y colaboradores (2012) estableció una asociación entre la intensidad de los síntomas de PsB, y los aislamientos de CPsV, encontrando que las variantes de secuencias se encontrarían en el RNA2 de CPsV, pudiendo ser éste RNA el responsable de la expresión de los síntomas.

Los desafíos que se realizaron con las plantas ihpCP, obtenidas por Reyes y colaboradores (2011) y los mostrados en el capítulo 3 fueron llevados a cabo con CPsV 90-1-1, aislamiento 100% homólogo al transgén ihpCP, y agente causal del síndrome PsA, representativo del tipo de psorosis en la región mesopotámica argentina. En éste capítulo se detallan los experimentos conducidos a ampliar el estudio del comportamiento de estas plantas ihpCP en cuanto a su resistencia frente a un aislamiento de CPsV heterólogo al transgén, que manifiesta el síndrome de PsB.

## **OBJETIVOS**

- Desafiar a las líneas ihpCP con el aislamiento heterólogo de CPsV 189-34 (PsB).
- Evaluar el comportamiento de las líneas ihpCP-10 y -15 frente a dicha infección.

## **HIPÓTESIS**

- Las líneas ihpCP-10 y -15 son resistentes al aislamiento de PsB, CPsV 189-34 mediante el mecanismo de silenciamiento génico.

## RESULTADOS

### A. Ensayo de infección de las líneas ihpCP-10 y -15 con el aislamiento CPsV 189-34

Se seleccionó el aislamiento CPsV 189-34 de PsB de origen argentino, utilizado durante décadas en la EAA INTA Concordia para la caracterización de este síndrome, y ensayos de protección cruzada para la confirmación de PsA. El fragmento ihpCP posee la secuencia de la región central del RNA3 de CPsV 90-1-1, que es la única región secuenciada. La figura 2 compara las secuencias disponibles de CPsV 90-1-1 (de la que deriva el transgén) y del aislamiento 189-34. Como se ve, entre ambas secuencias hay un solapamiento de 213 nt, y se encontró un 97% de homología en el mismo.

Se determinó por análisis bioinformático la probabilidad de que los siRNA-ihpCP pudieran desencadenar el silenciamiento del RNA3 de CPsV 189-34 utilizando la predicción de secuencias de siRNA del capítulo 2. En ella se había encontrado que la región ihpCP con mayor probabilidad de producción de especies de siRNA era el extremo 3' (ubicados entre los nucleótidos 209 y 323 del fragmento ihpCP). Este extremo forma parte del solapamiento entre las secuencias de ambos aislamientos, por lo que los siRNA fueron ubicados en la secuencia de CPsV 189-34, hallándose un 100% de homología. Es decir que existe una alta probabilidad de que los siRNA-ihpCP silencien el gen *cp* del virus causante de PsB.

Con este aislamiento de PsB, se llevó a cabo un experimento de desafío que incluyó las dos líneas ihpCP seleccionadas para todos los experimentos de esta tesis: ihpCP-10 y -15; además del control de regeneración 6099. Éstas tres líneas fueron propagadas, injertando yemas de las plantas madres en plantines de Limón Rugoso.

```

CPsV 189-34 -----
CPsV 90-1-1 (1) GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGGAGTGTGTGATTCTGATATTATCAAAAATAT

CPsV 189-34 -----
CPsV 90-1-1 (55) CAGAGTGGCAAAAAGAGCAATCCAAGCAGCCTTTGTGCTGGTTTTTACACAAGG

CPsV 189-34 (1) -----ACAAAGAAAAGTTCCTGAATTTGTTAAATC
CPsV 90-1-1 (109) GTCTCTTCCTGGAAAAGCTGATGACAAAGAAAAGTTCCTGAATTTGTTCAAATC
Consensus ACAA AGAAAAGTTCCTGAATTTGT AAATC

CPsV 189-34 (32) AAAGCTATATGATGGTGTGAGCCTATCACAAATCAGTGAGGAGCTGAGTCA
CPsV 90-1-1 (163) AAAGCTATATGATGGTGTGAGCCTATCACAAATCAGTGAGGAGCTGAGTCA
Consensus AAAGCTATATGATGGTGTGAGCCTATCACAAATCAGTGAGGAGCTGAGTCA

CPsV 189-34 (86) TGCTCCACAAAGAAATTCCCTGCTAGGGTGTTTCTCAAAATTGATATTGACAA
CPsV 90-1-1 (217) TGCTCCGACAAAGAAATTCCCTGCTCAGGGTGTTTCTCAAAATTGATATTGACAA
Consensus TGCTCC ACAAAGAAATTCCCTGC AGGGTGTTTCTCAAAATTGATATTGACAA

CPsV 189-34 (140) CCTACCGAGCGCTGTCTGCTCCAGATGCAAACCTGAACATTGCTGGAAATCGGTC
CPsV 90-1-1 (271) CTTACCGAGCGCTGTCTGTTCCAGATGCAAACCTGAACATTGCTGGAAATCGGTC
Consensus C TACCGAGCGCTGTCTG TCCAGATGCAAACCTGAACATTGCTGGAAATCGGTC

CPsV 189-34 (194) TGTGAGGTATGCTGGATTCTGCAAGCAGCTTCCAGACTAAACAAAAGTTGTCTCC
CPsV 90-1-1 (325) TGTGAGGTATGCTGGATTCTG-----
Consensus TGTGAGGTATGCTGGATTCTG

CPsV 189-34 (248) TGCTGTTGGAGCAACTCCCGAATCCTTGATGCCATTGCTGGAAACAAACCAAAA
CPsV 90-1-1 -----

CPsV 189-34 (302) AATTGAGAAATCAATTGCAATAAGGGATTTCTTAAAAACGATGGAAGGCCAGTG
CPsV 90-1-1 -----

```

Figura 2. Alineamiento entre las secuencias parciales disponibles en el Genebank de los aislamientos de PsA CPsV 90-1-1 (FJ495195.1) Y de PsB CPsV 189-34 (AM236000.1). Las secuencia mostrada de CPsV 90-1-1 coincide con la del fragmento ihpCP. Para realizar el alineamiento se utilizó el programa AlignX (NTiVector). La región de las secuencias solapadas presenta un porcentaje de identidad de 97%.

Para cada una de las líneas inicialmente se realizó un número de 15 propagaciones, pero que en el transcurso del desarrollo de las plantas quedaron 12, 14 y 13 réplicas de las líneas ihpCP-10, ihpCP-15 y no tg respectivamente. Las plantas se mantuvieron en un invernáculo a 22-24 °C con un fotoperíodo de 16 horas. El tiempo transcurrido entre la propagación de las líneas de cítrico a desafiar y el desafío con el virus suele ser de entre 12 a 14 meses, ya que es necesario que el tallo de la copa posea un diámetro apto

para realizar la inoculación mediante injerto, y luego posea un desarrollo foliar suficiente para examinar los síntomas, y toma de muestra.

Una vez crecidas, 7 plantas de cada grupo fueron inoculadas con el aislamiento CPsV 189-34 en los internódulos del CUIS (INTA EEA Concordia). Las plantas restantes se reservaron como controles sin inocular. La inoculación se desarrolló de igual manera que la descrita en el capítulo anterior, mediante injerto de una única pieza de corteza seleccionada, perteneciente a una planta infectada con CPsV 189-34 que manifestaba sintomatología marcada de Ps B. Luego éstas fueron podadas, y posteriormente se evaluó la infección luego de su brotación.

## B. Evaluación de la resistencia de las líneas ihpCP-10 y 15 frente a PsB

La infección fue evaluada mediante observación de síntomas, y detección molecular de CPsV para analizar si la resistencia implica una inhibición de la multiplicación viral, atenuación de la sintomatología o ambos.

En cuanto a la sintomatología, 2 de 7 de las copas control 6099 (no tg) desafiadas mostraron síntomas de shock al comienzo de la brotación, dos meses después de la infección, permaneciendo el resto asintomáticas hasta ese momento. Pero la aparición de los síntomas típicos de psorosis B (pústulas acumulación de goma, etc), se espera entre los 4 y 6 meses post-inoculación, por lo que se tomaron registros de los síntomas a los 2 y a los 6 meses post-inoculación, correspondiente a la primera brotación, como se muestra en la tabla 1.

Línea	2 mpi				6 mpi			
	Sh	P	G	M	Sh	P	G	M
ihpCP-10	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
ihpCP-15	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
No tg	2/7	0/7	0/7	0/7	2/7	1/7	5/7	3/7

Tabla 1. Síntomas de psorosis luego de la inoculación con CPsV 189-34 en la primera brotación, a los 2 meses post-inoculación (mpi), en naranja y 6 mpi en celeste, en las líneas ihpCP-10, -15, y 6099 (no tg). Fracción de individuos con síntomas sobre el total de individuos dentro de cada línea.

Sh: Shock (necrosis del brote joven). P: Pústulas. G: Acumulación de goma en la corteza. M: manchas foliares.

La sintomatología de las plantas desafiadas al final de la evaluación se observa en las figuras 3 y 4.



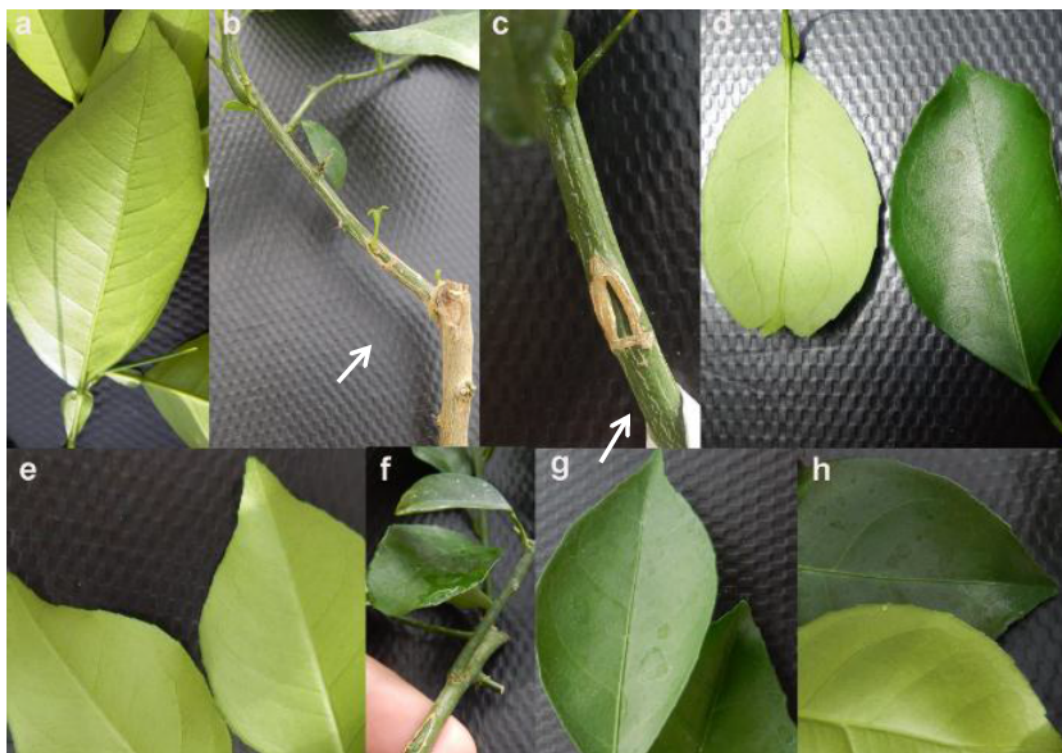


Figura 3. Imágenes de hojas y tallos de las copas ihpCP a los 6 meses post-inoculación con CPsV 189-34. Línea ihpCP-10 (a-d) e ihpCP-15 (e-h). a, d, e, g, h. hojas asintomáticas. b. pie de limón rugoso del que se observa el tallo de la copa ihpCP asintomático, con el segmento de corteza del inóculo injertada y con un pequeño brote que se desarrolla. c. tallo tg (asintomático) con la zona injertada. Las flechas indican el injerto del inóculo.

Como se ve, todas las plantas ihpCP permanecieron asintomáticas durante todo el período de observación (figura 3), mientras que el grupo de plantas no tg, además del shock manifestado en 2 individuos a los 2 mpi, mostró síntomas típicos de PsB en la mayoría de los individuos a los 6 mpi (figura 4). De las 7 plantas no tg desafiadas, 6 mostraron algunos de los síntomas de psorosis B (individuos 1 a 5 y 7), y el individuo 6 permaneció asintomático. Los síntomas típicos de PsB observados, son la acumulación de goma en tallo y hoja, y las pústulas en las ramas, que son exclusivos de este síndrome, manifestados en ensayos de invernáculo. El shock y las manchas, a pesar de ser síntomas compartidos con el síndrome PsA, indican que se trata de PsB por su intensidad. Es decir que los controles no tg parecen manifestar el síndrome PsB de acuerdo a su sintomatología.



Figura 4. Imágenes de hojas y tallos de las copas no tg a los 6 meses post-inoculación con CPsV 189-34. a. tallo con pústulas. b. tallo con acumulación de goma. c-d. shock. e-f. manchas foliares. g-h. hoja con manchas en las nervaduras también denominada “hojas de roble”, y acumulación de goma.

Si bien la sintomatología indica que la infección de CPsV 189-34 parece haber sido exitosa únicamente en los controles no tg, es necesario determinar la presencia de CPsV y cuantificar el título viral de cada individuo, para descartar que las plantas ihpCP permitan cierta multiplicación viral, pero que sean asintomáticas.

Para ello se acudió a la detección cuantitativa de la proteína CP por TAS-ELISA, y a la detección del RNA2 de CPsV por RT-PCR y del RNA3 por RT-qPCR. En todos los casos las determinaciones fueron realizadas en las hojas de las plantas desafiadas y de los controles sin inocular, al final del período de observación de la primera brotación, a los 6 mpi.

Los niveles de proteína CP obtenidos por TAS-ELISA para cada individuo se muestran en la figura 5.

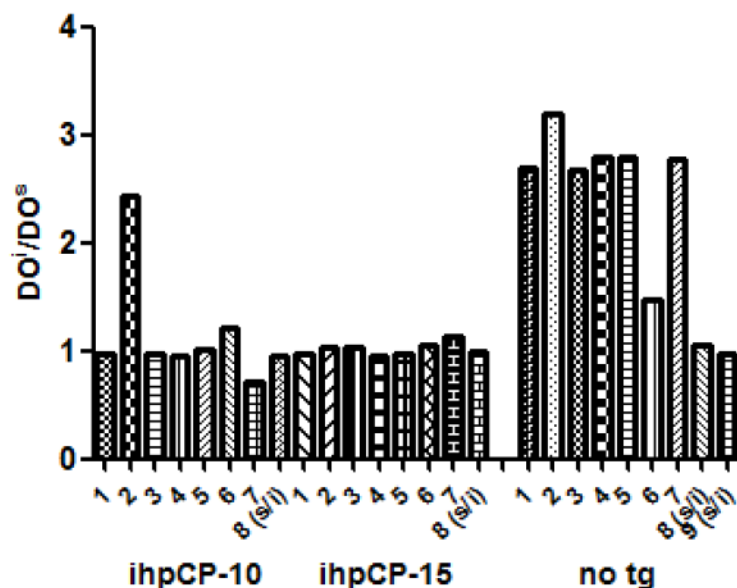


Figura 5. Detección cuantitativa de la proteína CP de CPsV por TAS-ELISA, de los individuos 1 a 7 inoculados y los individuos 8 y 9 sin inocular (s/i) dentro de cada grupo de las líneas ihpCP-10, ihpCP-15 y 6099 (no tg) respectivamente. DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub> representa el valor promedio de DO a 492 nm de los triplicados de cada individuo, dividido por el promedio del control sano.

Como se mencionaba en el capítulo anterior y se discutirá en el capítulo 5, para que una muestra sea positiva para CPsV por TAS-ELISA, debe presentar un cociente DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub> mayor o igual a 3, de acuerdo a reportes de Zanek et al (2006), entre 7-9 años atrás. Durante este tiempo la sensibilidad de la técnica ha descendido. Si se considera el punto de corte DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub>=2, aplicado en otros laboratorios (María Inés Plata, INTA Concordia y Mariano Cambra, IVIA España, comunicaciones personales), 6 de los 7 individuos no tg son positivos para CPsV, y también lo es el individuo ihpCP-10 -2, que alcanzó un valor de DO<sub>i</sub>/DO<sub>s</sub> de 2,7. El resto de los individuos de la línea ihpCP-10 y la totalidad de los individuos de la línea ihpCP-15 arrojaron valores por debajo del punto de corte; es decir que las proporciones de individuos infectados con CPsV por TAS-ELISA fueron 1/7 para ihpCP-10, 0/7 para ihpCP-15 y 6/7 para el control no tg. Ello sugiere que a los 6 mpi existe una inhibición de la infección viral en las líneas ihpCP-10 y -15.

Además se determinó la presencia del virus por RT-PCR convencional con los *primers* A/B sobre el RNA2 de CPsV, para todos los individuos. El par A/B fue diseñado sobre la secuencia de RNA2 del aislamiento CPV-4, por lo que previamente se probó que éstos hibridaran en el RNA2 de CPsV 189-34, en muestras infectadas con este aislamiento. La amplificación genera un amplicón del tamaño esperado (270 bp). Los resultados para las plantas desafiadas se muestran en la figura 6.



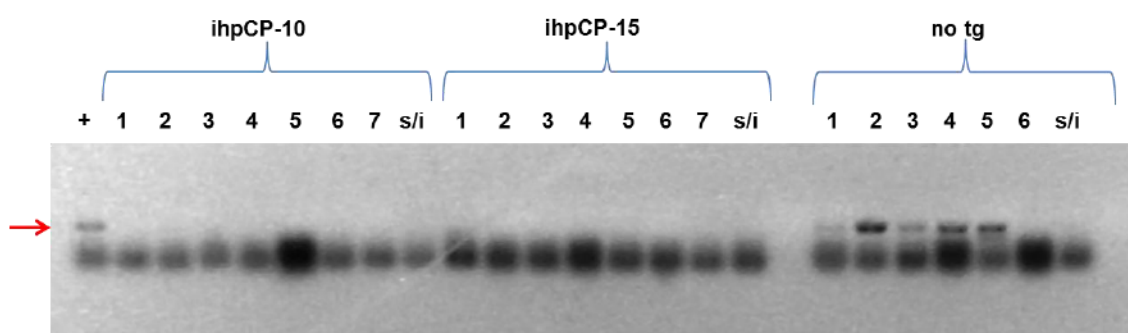


Figura 6. Análisis de los productos de RT-PCR con el par de cebadores A/B a partir de RNA de las copas desafiadas con CPsV 189-34 en gel de agarosa 1%. +: Control positivo (proveniente de hojas de la planta usada para inocular), en la calle 1. Las siguientes calles muestran los individuos 1 a 7 inoculados y un individuo sin inocular (s/i) dentro de cada grupo de las líneas ihpCP-10 y ihpCP-15, y los individuos 1 a 6 inoculados y uno s/i para la línea 6099 (no tg) respectivamente. La flecha roja de la izquierda indica la altura de la banda de aproximadamente 270 bp correspondiente al amplicón. Las bandas inferiores corresponden a los cebadores utilizados en la mezcla de reacción de PCR.

Se detectó la presencia del virus en todo el grupo de individuos no tg (a excepción del 6) y en el control de inóculo (control + de la figura 6), mientras que ninguno de los individuos ihpCP fueron positivos por este método. Si bien la sensibilidad de este protocolo podría ser menor a la de la RT-qPCR en el RNA3, y no permite cuantificación del título viral, es útil para analizar un RNA viral diferente del sometido a silenciamiento, y los resultados son coincidentes con el TAS-ELISA en todos los casos, a excepción del individuo ihpCP-10 -2, que fue dudoso por ELISA (cercano al punto de corte) y negativo por RT-PCR A/B.

Los individuos 6099-6 y el ihpCP-10 -2, que arrojaron resultados dudosos (el primero por ser negativo para CPsV a pesar estar inoculado, y el segundo por la no concordancia entre el TAS-ELISA y la RT-PCR A/B) fueron analizados por RT-qPCR con el par de *primers* 55i/C1 que, como se explicaba en los capítulos anteriores, amplifica un fragmento de cDNA proveniente del RNA3 sobre su extremo 3', por fuera de la secuencia del ihpCP. Ninguno de estos dos individuos mostró amplificación, sugiriendo que ese control no tg no se infectó con CPsV en el desafío, y que tampoco lo hizo el individuo ihpCP-10 -2.

Entonces las líneas ihpCP también son resistentes al virus CPsV 189-34 causante del síndrome PsB, ya que en ellas no se observó ninguna expresión de síntomas de psorosis, y una inhibición de la multiplicación viral, a los 6 mpi. De esta forma, en la primera brotación y hasta los 6 mpi, se valida la hipótesis planteada al comienzo de este capítulo.



## CONCLUSIONES

- Se desafió a las líneas ihpCP-10 y -15, y al control no tg 6099 con el aislamiento argentino CPsV 189-34 causante del síndrome PsB, transmitiéndolo por injerto en las copas de las plantas LR/ihpCP-10 y -15..
- Se encontró una marcada inhibición de la multiplicación viral en las líneas ihpCP con respecto a los controles no tg, que manifestaron la enfermedad PsB determinada por observación de síntomas, RT-PCR sobre el RNA2 y TAS-ELISA de la proteína CP de CPsV.
- Las líneas ihpCP evaluadas se comportan como resistentes frente al aislamiento CPsV 189-34 de PsB.

## DISCUSIÓN

En este estudio se profundizó el conocimiento sobre el rango de resistencia de las líneas ihpCP a psorosis.

Desde el punto de vista del mecanismo molecular que otorga la resistencia, no se han realizado nuevas determinaciones con estas plantas, pero se sabe, por el estudio de Reyes et al. (2011) que se debe al silenciamiento génico. Se utilizaron las herramientas bioinformáticas del capítulo 2 para predecir las secuencias de siRNAs generadas por el tejido ihpCP, y la zona de mayor producción de siRNAs (extremo 3' del transgén ihpCP) coincide con el solapamiento de ésta con la secuencia del RNA3 de CPsV 189-34, donde se halló un porcentaje de homología del 97% (figura 2). Este hecho indica que los siRNA-ihpCP generados en estos tejidos poseen la diversidad de secuencia suficiente como para desencadenar el silenciamiento de genes no homólogos.

En el ensayo de desafío se encontró que las líneas ihpCP evaluadas presentan resistencia a CPsV 189-34, un aislamiento heterólogo al gen con el que fueron transformadas, y causante del síndrome PsB.

El análisis de la infección por TAS-ELISA mostró un único individuo ihpCP con un valor cercano al punto de corte. Este hecho sugiere que la multiplicación viral podría estar inhibida, pero no completamente bloqueada. De todos modos este valor dudoso fue reportado como negativo por los otros dos métodos.

Los controles no transgénicos desafiados en este ensayo presentaron un amplio rango de títulos virales, e incluso uno de los 7 individuos no se infectó, de acuerdo a este análisis. Ello podría explicarse por una carga viral no uniforme que presente el inóculo. Como se explicaba en el capítulo anterior, la inoculación por injerto de un segmento de corteza fue estandarizada, pero aún así no es posible controlar la cantidad de partículas virales que contiene cada segmento. Además cada planta presenta una condición

fisiológica propia, que la hace más o menos susceptible a la enfermedad, por lo que con un número estadístico de individuos estas variaciones pueden ser estimadas en su significancia.

Cabe mencionar que una de las desventajas de la transmisión de virus por injerto es que en el inóculo posee una carga viral bastante más grande que la esperada por la difusión natural, cualquiera sea su vector. Si bien las propagaciones de las líneas ihpCP-10 y -15 han sido resistentes, no podemos descartar que la resistencia de algún individuo, en los ensayos de invernadero, pudiera quebrarse por un inóculo con carga viral muy alta, mientras que en otro individuo la carga viral del inóculo haya sido menor y por ende, comportarse resistente.

Estos resultados también aportan evidencias experimentales de que la protección cruzada que se observa entre PsA y PsB, cuando los aislamientos fueron extraídos del mismo árbol, está dada por el silenciamiento génico de los RNA virales, específico de secuencia. Sin embargo, cabe destacar, que en los ensayos de protección cruzada, la planta que fue previamente infectada con PsA sólo protege contra el conjunto de síntomas que provocaría PsB, mientras que los síntomas ya generados por el primer virus, continúan observándose.

En las líneas ihpCP, al menos hasta los 6 mpi, no se observan síntomas, indicando que, como se esperaba, tanto los síntomas de PsA como los de PsB son bloqueados cuando el RNA3 es degradado. Reyes et al (2011) ya había arrojado alguna hipótesis en este sentido, diciendo que probablemente la proteína de cubierta, tuviera un rol muy temprano y necesario para que la multiplicación viral se inicie. Por lo tanto, es probable, que tanto los virus que dan el síndrome de PsA como los de PsB estén impedidos de replicarse, independientemente de que sus RNA2 posean la capacidad de manifestar síndromes diferentes, como ha sido asociado por los estudios de polimorfismo que realizó Velázquez et al (2012).

Todos estos resultados y reflexiones, también son relevantes desde el punto de vista biotecnológico, ya que estas plantas ihpCP también podrían resistir en el campo a infecciones de diferentes aislamientos de CPsV, evitando tanto el síndrome PsA como el PsB. Tanto CPsV 90-1-1 como CPsV 189-34 son aislamientos provenientes de campos argentinos, y probablemente sean el resultado de la evolución de linajes virales con diferente nivel de virulencia, como fue probado para otros virus vegetales como *Pepino mosaic virus* (PepMV), donde se generaron linajes independientes del virus desde un aislamiento de baja virulencia, y el resultado de la evolución diversificó esa característica, generando virus con diferente nivel de virulencia que provocan diferente sintomatología en las plantas hospedadoras (Minicka et al. 2015).

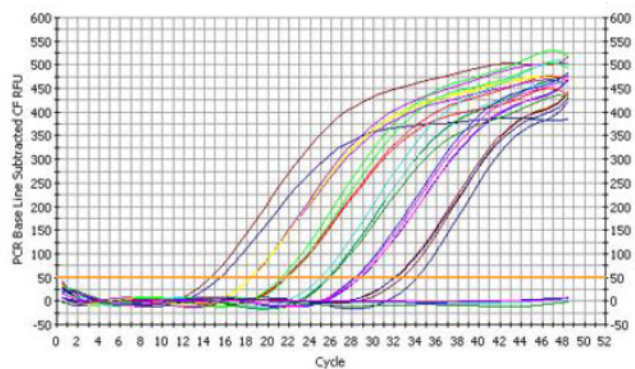
## PERSPECTIVAS

- A pesar de que la resistencia a PsB fue comprobada hasta los 6 mpi, y ésta podría fácilmente atribuirse al silenciamiento génico, sería interesante indagar en la acumulación de siRNA de estas plantas durante la inoculación con CPsV 189-34, para comprobar que es este mecanismo es el responsable de la resistencia.
- Si bien se cuenta con la predicción bioinformática de algunas secuencias de siRNA que actuarían en el genoma de CPsV 189-34 por ser 100% homólogas, ello debería corroborarse con la secuenciación de los siRNAs, o al menos con una búsqueda de siRNA secundarios, y que fueran generados por transitividad en el extremo 3' del RNA3 como lo ha sugerido la bioinformática.
- Se pretende completar el estudio de la resistencia de las líneas ihpCP frente a PsB, incluyendo ensayos como los realizados en el capítulo 3 para PsA. Esto es, analizar el comportamiento de estas plantas a largo plazo y determinar si la resistencia es completa o se trata de una inhibición parcial de la infección; determinar si el virus está multiplicándose en el pie LR sobre el que se propagaron las líneas ihpCP; y realizar un doble *heterografting* para evaluar la transmisión del silenciamiento a la copa.
- Ya que las líneas ihpCP mostraron resistencia a CPsV 189-34, aislamiento muy virulento y causal de PsB, pero muy relacionado filogenéticamente a CPsV 90-1-1, resulta interesante desafiar a estos cítricos transgénicos con otro aislamiento de CPsV, también causal de PsA, pero evolutivamente más alejado, y con un menor porcentaje de homología en la región ihpCP, como es CPV-4, originario de Estados Unidos. Estos ensayos se realizarán en el corto plazo, ya que las réplicas ihpCP- 10, -15 y 6099 han sido generadas en la EEA INTA Concordia, y se dispone de este inóculo en dicha institución. Sólo resta efectuar la inoculación y evaluar la posterior infección.

## Capítulo 5

### Desarrollo de una nueva técnica de detección de la enfermedad psorosis de los cítricos y transgenes derivados de CPsV mediante RT-qPCR

- A. Diseño de cebadores, desarrollo de la RT-qPCR y análisis de la especificidad
- B. Análisis de la sensibilidad de RT-qPCR para CPsV
- C. Comparación de la RT-qPCR con el TAS-ELISA
- D. Detección de diferentes aislamientos de CPsV
- E. Detección en muestras de campo
- F. Detección de fragmentos derivados del gen *cp* de CPsV en cítricos transgénicos







## INTRODUCCIÓN

Como se detalló en la introducción general, la detección de CPsV en Argentina y el mundo ha sido motivo de numerosas investigaciones. La detección cuantitativa halló su mayor grado de precisión en el TAS-ELISA desarrollado por Zaneck et al. (2006). Pero la caducidad de los anticuerpos, sumado a algunas ambigüedades en la definición del punto de corte, etcétera, hacen que sea necesaria una técnica de detección cuantitativa superadora.

El diagnóstico en Argentina hasta hoy se sigue llevando a cabo mediante ensayo biológico, que demanda mucho tiempo, requiere de un gran número de plantas es bastante costoso, y son necesarios recursos humanos capacitados para la observación de síntomas en plantas indicadoras, técnicas de manejo en el invernáculo y mantenimiento de las mismas durante el período del indexado. Esta situación señala la necesidad de alcanzar un método de diagnóstico validado alternativo al ensayo biológico, y si fuera posible con un nivel de detección superior al necesario para la manifestación de síntomas.

El desarrollo de una técnica cuantitativa validada para el diagnóstico resolvería los dos aspectos descritos anteriormente. En este capítulo se describirán los avances realizados en este tema, y las perspectivas que se abren en base a este trabajo.

## OBJETIVOS

- Desarrollar un protocolo de RT-qPCR que permita detectar CPsV en muestras vegetales de Argentina y otros países citrícolas del mundo.
- Validar la técnica para diversos tipos de muestras: edad de la planta/brote, de campo e invernáculo.
- Ajustar la cuantificación para superar la sensibilidad aportada por el método vigente (TAS-ELISA) y su comparación.
- Aplicar dicha técnica a la detección de transcritos provenientes de transgenes CP e ihpCP en cítricos transgénicos desarrollados en nuestro laboratorio.

## HIPÓTESIS

- La metodología de RT-qPCR desarrollada es específica para la detección de CPsV.
- La sensibilidad de la detección y la cuantificación por RT-qPCR es superior a la del TAS-ELISA.

- Mediante este método se puede detectar CPsV en muestras de diverso origen, edad y estado fisiológico.
- Este método es aplicable a la detección de transgenes derivados de CPsV en cítricos transgénicos.

## RESULTADOS

### A. Diseño de cebadores, desarrollo de la RT-qPCR y análisis de la especificidad

En el presente trabajo se ha desarrollado un protocolo de RT-qPCR para detectar un fragmento de la CP de CPsV, codificada en el RNA3 de su genoma, con el objetivo antes mencionado de lograr la detección de CPsV en todas las muestras infectadas principalmente de Argentina, y otras regiones cítricas del mundo y, para determinar la expresión del transgén ihpCP en plantas de cítricos transgénicos (mostrado en los capítulos anteriores).

Teniendo en cuenta que la región 5' del gen *cp* es más conservada que la región 3' (Alioto et al. 2003), se buscó una zona en la región 5' para diseñar los cebadores. Se realizó entonces un alineamiento múltiple de las regiones 5' de diferentes secuencias de CPsV disponibles en el *GenBank*, incluyendo aislamientos representativos de Argentina, Italia, España y EE.UU. (Martin et al. 2006). La figura 1 muestra un fragmento conservado de 113 nt, situado entre los nt 738 y 850 de la secuencia viral complementaria del RNA 3 de CPsV. Los cebadores (*primers*) CP1c y CP3 se diseñaron en la región más conservada, que es 100% homóloga a la secuencia del aislamiento argentino de PsA CPsV 90-1-1. Los porcentajes de identidad en la región amplificada entre CPsV 90-1-1 y los demás aislamientos alineados fueron: 90% con NA63, el 89% con P-121, y el 87% con CPV4, siendo este último el aislado más distante, de acuerdo con estudios previos (Martin et al. 2006).

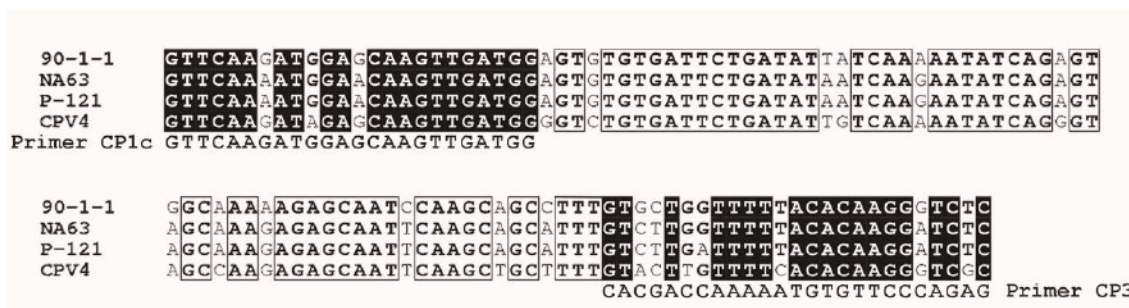


Figura 1. Alineamiento de secuencias del *GenBank* de aislamientos de CPsV provenientes de Argentina (superior), Italia, España y Estados Unidos (inferior), en el fragmento amplificado CP1c/CP3. La homología en la región en que hibridan los *primers* está señalada en negro. La homología en el resto del amplicón está indicada con recuadros.

Para optimizar las condiciones de la qPCR, se determinó la temperatura óptima de hibridación para el par de cebadores CP1c/CP3, utilizando una PCR en gradiente de temperatura de 52 a 58°C, siendo 56°C la condición óptima.

Se determinó también la especificidad de la medida de fluorescencia SYBR Green en la qPCR. Para ello se analizaron las curvas de temperatura de fusión (*melting*) de los fragmentos amplificados. La figura 2a muestra un pico de *melting* característico a 79,5 °C  $\pm$  0,5°C para el producto del gen *cp*, en muestras positivas para CPsV, tales como S1 y S2, pero no en muestras de cítricos sanos, como S3. En ninguna de estas muestras se observaron picos de *melting* inespecíficos.

Para obtener una cuantificación que además sea comparable entre muestras, es necesario contar con un método de normalización, utilizando genes de referencia (Kozera and Rapacz 2013). En este trabajo fue seleccionado el gen ubiquitina como control interno, ya que su expresión es altamente conservada en todas las especies de cítricos y ha sido reportado que es estable bajo diferentes condiciones de crecimiento (Boava et al. 2011). Se utilizó el par de *primers* ubqtL/ubqtR (Reyes et al. 2015), diseñado sobre la secuencia del transcripto del gen ubiquitina GU362416.1 de *C. sinensis*, para amplificar un fragmento de este gen que posee un tamaño de 127 nt. En las curvas de *melting* de este producto génico (ubqt) se observó un máximo a 84°C  $\pm$  0,5°C, presente en todas las muestras (Fig. 2a).

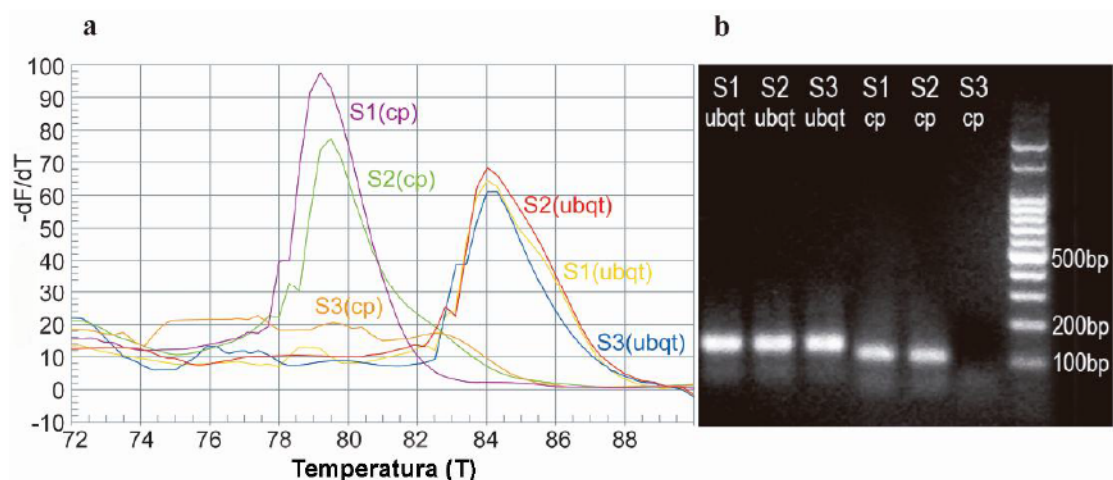


Figura 2. Análisis de los productos de la RT-qPCR en muestras positivas para CPsV (S1 y S2) y negativas (S3). (a) Curvas de *melting*. Derivada de la Fluorescencia en función del tiempo ( $-dF/dT$ ) versus temperatura (°C), para los productos cp y ubqt; (b) Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas correspondientes a fragmentos de 127 y 113 nt, para los productos cp y ubqt respectivamente. La calle de la derecha muestra el marcador de peso molecular comercial de 100 bases (PROMEGA).

El análisis electroforético de los productos de qPCR para ambos pares de cebadores muestra bandas únicas correspondientes a los tamaños esperados, y no revela bandas inespecíficas, ni tampoco una marcada presencia de dímeros de *primers* (Fig. 2b).



Para confirmar que los productos de qPCR amplificados con los *primers* CP1c/CP3 a partir de los aislamientos argentinos de CPsV 90-1-1, 173-22 y 504-3 (Tabla 1), fueran los fragmentos esperados, éstos fueron purificados, clonados en el vector pGEM®-T y luego de confirmar la presencia del inserto, se seleccionaron 3 clones de cada aislamiento y se secuenciaron, obteniendo en todos ellos la secuencia esperada.

Además se utilizó la herramienta bioinformática BLASTn para analizar si la secuencia de este amplicón presentaba homología con alguna otra secuencia disponible en la base de datos *GenBank*, pretendiendo descartar fundamentalmente la amplificación de algún fragmento del genoma de cítrico, o bien de algún patógeno de cítricos diferente de CPsV. En esta búsqueda, únicamente se encontró similitud con secuencias de CPsV.

Aislamiento de CPsV	Especie en que se aisló	Especie en que se mantuvo en invernáculo	País de origen	Psorosis tipo	Síntomas
90-1-1	Trifolio ( <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)	Naranja Dulce Pineapple (NDP) ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osb.) y limón rugoso ( <i>Citrus jambhiri</i> Lush.)	Argentina	A	F, S, Sh
112-1	Mandarina Willowleaf ( <i>Citrus deliciosa</i> Tenore)	NDP	Argentina	A	F, S, Sh
CPV-4	NDP	NDP	Estados Unidos	A	F, S
P-121	NDP	NDP	España	A	F, S
173-22	Mandarina Ellendale ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco)	NDP	Argentina	-	Sh, F, M, V
189-34	NDP	NDP	Argentina	B	G
P-250	NDP	NDP	Estados Unidos	B	BS, P
504-3	NDP	NDP	Argentina	A	Sh, F, BS
248-2	Mandarina Satsuma ( <i>Citrus unshi</i> Marcovitch)	NDP	Argentina	A	F, S, Sh

Tabla 1. Aislamientos de CPsV utilizados en estos estudios y plantas indicadoras en las que éstos fueron mantenidos en invernáculo. Síntomas encontrados al momento de la caracterización de los aislamientos. F: flecking (fleclos cloróticos), S: spots (manchas), and Sh: shock (necrosis en brotes jóvenes), M: moteado, V: variegado, G: goma acumulada en hojas maduras y ramas, BS: bark scaling (descamado del tronco), P: pústulas.

Con el fin de determinar la especificidad de la RT-qPCR y descartar detecciones inespecíficas de otros patógenos, además de los cítricos sanos, se incluyeron muestras de hojas de cítricos infectadas con otros patógenos presentes en las regiones de cítricos de Argentina. Además se incluyó una muestra de hojas de lechuga (*Lactuca sativa*)

infectadas con *Mirafiori lettuce Big-vein virus* (MiLBVV), agente causal de la enfermedad denominada en inglés *big vein*, que es otro miembro de la familia *Ophioviridae*, con un genoma filogenéticamente muy cercano al de CPsV incluyendo el gen *cp* (Roggero et al. 2000). En el caso de ésta última muestra, la amplificación con el par CP1c/CP3 resultó negativa (Tabla 2). Para las muestras de cítricos infectados con otros patógenos se tomaron muestras de hojas de árboles del predio de la Estación Experimental INTA Concordia. Allí fueron diagnosticadas para los patógenos sospechados, y luego enviadas a nuestro laboratorio para ser analizadas para CPsV por RT-qPCR. Como se aprecia en la Tabla 2, las muestras infectadas con Clorosis variegada de los cítricos (CVC) y con *concave gum* (CG) dieron resultados negativos para CPsV. De dos muestras positivas para tristeza (CTV), una fue positiva para CPsV (CTV 126-13), y una negativa para CPsV (CTV 268-1). En el caso de muestras cítricas con canchros, dos de ellas fueron positivas para CPsV (naranja Valencia 1 y 2), y dos negativas (naranja Valencia 3 y pomelo Ray Rubí) (Tabla 2).

Especie/variedad hospedadora	Origen	Enfermedad/agente causal	Detección de CPsV por RT-qPCR
Lechuga	La Plata, Argentina (campo)	Big-vein / MiLBVV <sup>a</sup>	-
Naranja Dulce Pineapple (NDP)	Concordia, Argentina (invernáculo)	Tristeza / CTV (aislamiento 126-13) <sup>b</sup>	+
Lima Key	Concordia, Argentina (invernáculo)	Tristeza / CTV (aislamiento 268-2) <sup>c</sup>	-
Naranja Salustiana	Concordia, Argentina (campo)	Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) / <i>Xylella fastidiosa</i> <sup>d</sup>	-
NDP	Estados Unidos (invernáculo)	Concave gum (CG-301) <sup>e</sup>	-
Naranja Valencia	Concordia, Argentina (campo)	Cancrosis / <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (1) <sup>f</sup>	+
Naranja Valencia	Concordia, Argentina (campo)	Cancrosis / <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (2) <sup>f</sup>	+
Naranja Valencia	Concordia, Argentina (campo)	Cancrosis / <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> <sup>f</sup>	-
Pomelo Ray Ruby	Concordia, Argentina (campo)	Cancrosis / <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (3) <sup>f</sup>	-

Tabla 2. Especificidad de la RT-qPCR. Detección de CPsV en muestras de cítricos y lechuga infectadas con otros patógenos. RT-qPCR (+) equivale a Ct ≤ 30.

<sup>a</sup> Muestra de hojas con síntomas de *Big-vein* y positivas para MiLBVV mediante RT-PCR.

<sup>b</sup> Muestra de hojas extraídas de un árbol de NDP de campo que resultó positivo para CTV por test biológico.

<sup>c</sup> Muestra de hojas extraídas de un árbol de Lima Key de invernáculo que resultó positivo para CTV por test biológico, y por análisis molecular (Iglesias et al. 2008).

<sup>d</sup> Muestra de hojas extraídas de un árbol de Naranja Salustiana de campo que resultó positivo para CVC por DAS-ELISA (Agdia®).

<sup>e</sup> Muestra de hojas extraídas de un árbol de NDP de invernáculo positivo para *conclave gum* (por ensayo biológico) y mantenido en invernáculo (Roistacher et al. 2000).

<sup>f</sup> Muestra de hojas extraídas de un árbol de Naranja Valencia de campo, positivo para Cancrosis (por ensayo biológico). (1), (2) y (3) indican 3 árboles distintos de campo.

Estos ensayos mostraron que la RT-qPCR desarrollada con los cebadores CP1c/CP3 es específica para la detección CPsV, incluso en muestras de campo que presentan infecciones mixtas como tristeza/psorosis y cancrrosis/psorosis, como frecuentemente podría encontrarse.

## B. Análisis de la sensibilidad de RT-qPCR para CPsV

Se analizó la sensibilidad del protocolo de RT-qPCR calculando la correlación entre el ciclo umbral (*threshold cycle*, Ct) y el número de copias para el fragmento cp, mediante una curva de calibración. Se aplicó el mismo análisis para el producto ubqt, utilizado como control interno. Las curvas de calibración para ambos amplicones se realizaron a partir de diluciones seriadas de los fragmentos CP1c/CP3 y ubqtL/ubqtR, previamente purificados y cuantificados. Para el caso del amplicon CP1c/CP3 se seleccionó un rango de diluciones tal que comprenda los valores de Ct que de acuerdo a nuestra experiencia se encuentran frecuentemente en muestras de plantas infectadas con CPsV, tanto de campo como de invernáculo. En el caso de ubqt, el rango utilizado fue de  $10^5$  a  $10^8$  copias, ya que la concentración de molde utilizada contiene normalmente alrededor de  $10^7$  copias. Los coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ) para dichas curvas fueron 0,9913 para cp y 0,9904 para ubqt, como se muestra en las figuras 3a y 3b respectivamente, indicando que la técnica presenta una elevada sensibilidad para estos ensayos.

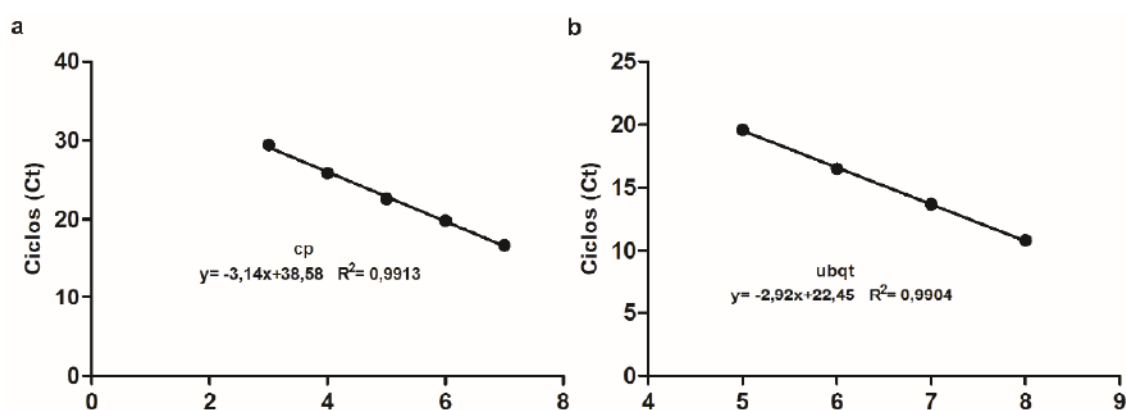


Figura 3. Curvas de calibración por RT-qPCR. Se grafica el número de ciclos, *Threshold Cycle* (Ct) versus el logaritmo del número de copias de DNA de: (a) el producto de amplificación de los primers CP1c/CP3 (cp), desde  $10^3$  a  $10^7$  copias; (b) el producto de amplificación de los primers ubqtL/ubqtR (ubqt), desde  $10^5$  a  $10^8$  copias. Los parámetros de la recta y los coeficientes de regresión lineal están indicados dentro de cada gráfico.

El mínimo número de copias del producto cp que pudo detectarse en estos ensayos fue  $10^3$ , dado que a partir de la dilución correspondiente a  $10^2$  copias no se visualizan bandas en la electroforesis posterior a la amplificación, ni tampoco está presente el pico de *melting* característico de ese amplicón. Los valores de Ct mayores a 30 se superponen con los Ct de los controles negativos (sanos), por lo que el punto de corte



para los valores de Ct fue establecido en 30. Por encima de este número de ciclos, la muestra es considerada negativa, siempre que se correlacione con la ausencia de pico de *melting* y la ausencia de bandas en la electroforesis.

Luego se estudió la expresión del gen ubiquitina en diferentes muestras sanas e infectadas con CPsV, para determinar si los niveles de expresión de ubqt son alterados por la infección viral. Se consideró un total de 50 muestras ensayadas por RT-qPCR (25 positivas para CPsV y 25 negativas) que incluían hojas de diferentes edades, estados fisiológicos y orígenes. Se listaron sus valores de Ct y se compararon estadísticamente. Los valores promedio fueron 14,1 $\pm$  0,7 y 13,8 $\pm$  0,9 para muestras positivas y negativas respectivamente. Además se aplicó un test de *Student* con 95% de confianza para comparar ambos grupos de Cts, y el *P-value* arrojado fue 0,5149 ( $P > 0.05$ ), es decir, que no existen diferencias significativas entre ambos grupos. Estos resultados demuestran que la expresión de ubqt es estable y no se ve alterada por la infección con CPsV, aportando así evidencia experimental sobre la utilidad de ubqt como control interno en este sistema. Entonces, el protocolo desarrollado y el control interno seleccionado sirven para obtener cuantificaciones precisas. Los valores son calculados como el número de copias promedio entre réplicas (calculadas por interpolación en la curva de calibración) y el promedio del número de copias de ubqt (obtenido del mismo modo), como se muestra en la tabla 3.

### C. Comparación de la RT-qPCR con el TAS-ELISA

También se comparó la sensibilidad del nuevo protocolo de RT-qPCR con la del TAS-ELISA, que hasta ahora ha sido el método cuantitativo de referencia, utilizado en muchas regiones citrícolas del mundo, además de estar probado y comparado con otras diversas técnicas de diagnóstico (Martin et al. 2002; 2004). Para esto, se tuvo en cuenta que las muestras fueran comparables, por lo que se utilizaron diluciones seriadas de la misma muestra, cuyo procesamiento fue realizado en paralelo (figura 4) para ambas técnicas. La muestra positiva fue tomada de hojas de un limón rugoso (LR) infectado con CPsV, y la negativa de un LR sano. Para que fuera lo más homogénea posible, el tejido foliar fue molido, y luego se extrajeron dos alícuotas idénticas de 200mg para proceder a la extracción de RNA y proteínas. Una vez obtenidos ambos extractos, se realizaron diluciones seriadas del extracto infectado, usando como diluyente el extracto sano en lugar de buffer, para que la concentración de RNA y proteínas sea igual en todas las diluciones, y lo único que varíe sea la proporción de moléculas provenientes del virus. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado, tanto para la RT-qPCR como para el TAS-ELISA.



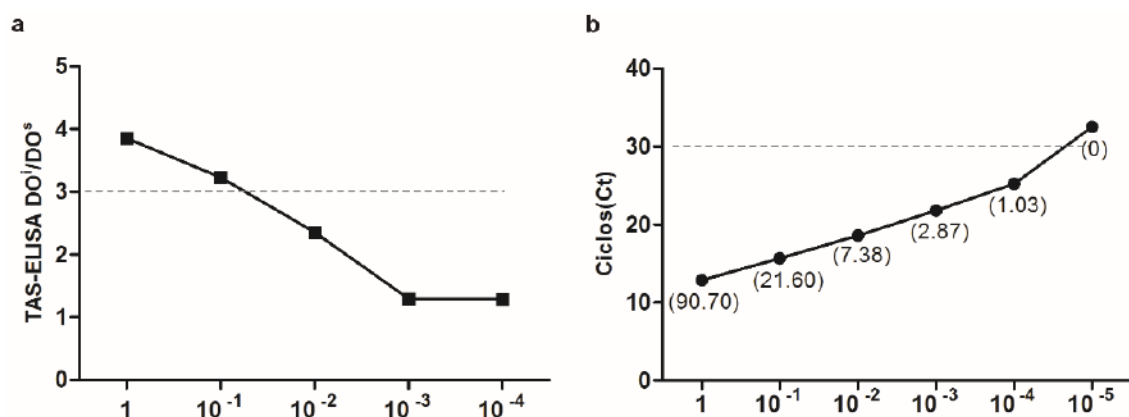


Figura 4. Diluciones seriadas (1/10) de RNA total y proteínas, preparadas a partir del mismo extracto de tejido foliar cítrico infectado con CPsV 90-1-1, diluido en extracto de tejido foliar cítrico sano, analizado por (a) TAS-ELISA; y (b) RT-qPCR. (a)  $DO^{492nm}/DO^s$  calculada como la  $DO^{492nm}$  promedio de los triplicados de la muestra, dividido el mismo promedio del control sano; (b) Ciclos *Threshold Cycle* (Ct) promedio de los triplicados. Los números indicados entre paréntesis expresan el número de copias del producto cp dividido 100 copias de ubqt. Las líneas punteadas indican los puntos de corte:  $Ct=30$  para la RT-qPCR; y  $DO^{492nm}/DO^s=3$  para el TAS-ELISA.

Una muestra analizada por TAS-ELISA es considerada positiva para CPsV cuando el promedio de  $DO^{492nm}$  de la muestra dividido el promedio de  $DO^{492nm}$  del control sano ( $DO^{492nm}/DO^s$ ) arroja un valor mayor o igual a 3 (Alioto et al. 1999; Zaneck et al. 2006). Solamente las muestras sin diluir (1), y la dilución 1/10 ( $10^{-1}$ ) resultaron positivas por este método (figura 4a). En cambio, por RT-qPCR se detectaron como positivas las muestras hasta la dilución  $10^{-4}$  inclusive (figura 4b). De estos resultados se concluye que la RT-qPCR desarrollada en este trabajo, aporta una herramienta para la detección de CPsV que es tres órdenes de magnitud más sensible que el TAS-ELISA.

#### D. Detección de diferentes aislamientos de CPsV

Se realizó un ensayo ciego con 14 muestras de plantas cítricas mantenidas en los invernáculos de la EEA-INTA Concordia, que fueron enviadas con rótulos numéricos sin discriminar el tipo de muestra. Luego del ensayo se reveló la identidad de las mismas, que incluían 5 plantas sanas y 9 plantas correspondientes a diferentes aislamientos de CPsV, incluyendo PsA y PsB, y abarcando diversidad de sintomatología y distribución geográfica. Estas muestras fueron analizadas por los dos métodos cuantitativos a comparar: RT-qPCR y TAS-ELISA (tabla 3). La descripción de los síntomas fue realizada en la EEA INTA Concordia, por la Ing. Norma Costa.

Muestra	Síntomas	Diagnóstico por TAS-ELISA	RT-qPCR (Ct promedio +/- SD)	Cuantificación por RT-qPCR (copias cp/100 copias ubqt)	Diagnóstico por RT-qPCR
CPsV 189-34	Sh, V, F, S, G	+	17.9 +/- 0.2	3.6	+
CPsV P-250	F, S, G, P	+	15.8 +/- 0.6	7.6	+
CPsV 504-3	Sh, F, M, V	+	19.2 +/- 0.8	8.0	+
CPsV 293-24	M	+	19.8 +/- 0.9	5.2	+
CPsV 173-22	Sh, F, M, V	+	21.1 +/- 0.2	2.3	+
sano 1	no	-	31.3 +/- 0.2	0	-
sano 2	no	-	34.5 +/- 0.4	0	-
sano 3	no	-	32.0 +/- 0.1	0	-
sano 4	no	-	30.5 +/- 0.9	0	-
sano 5	no	-	29.8 +/- 0.7	0	-
CPsV 90-1-1	Sh, F, M, V	+	15.3 +/- 0.4	18.2	+
CPsV 112-1	Sh, F, M, V	+	19.0 +/- 0.5	11.5	+
CPsV 248-2	Sh, F, M, V	+	15.3 +/- 0.6	5.6	+
CPV-4 isolate	S	+	18.5 +/- 0.3	1.4	+

Tabla 3. Comparación entre los resultados obtenidos por TAS-ELISA y RT-qPCR en el ensayo de invernáculo con diferentes aislamientos de CPsV. TAS-ELISA (+) equivale a  $DO/DO^s \geq 3$ . RT-qPCR (+) equivale a  $Ct \leq 30$ . Ct promedio entre duplicados; SD: Desviación estándar.

Síntomas al momento del muestreo: Sh: shock, V: variegado, F: flecking, S: spots, G: Goma, M: moteado, P: pústulas.

Como se observa, ambos métodos coincidieron en el diagnóstico de todos los aislamientos ensayados, incluyendo CPV-4 que es el más distante filogenéticamente (Martín et al. 2006); así como también en las plantas sanas. En cuanto a la cuantificación, es muy importante aclarar que ambos métodos no son comparables. El

TAS-ELISA mide la proteína de cubierta viral, y la RT-qPCR el RNA3 de CPsV, por lo que no necesariamente debe existir una correlación entre los mismos.

### E. Detección en muestras de campo

Para el muestreo de campo se utilizó el lote 504 (Beñatena and Portillo 1984) ubicado en la EAA INTA Concordia, donde se encuentra una alta incidencia de psorosis y por lo tanto fue conveniente analizar estos individuos. Estos árboles, fueron plantados en condiciones de sanidad conocida (libres de virus) alrededor de 25 años atrás, y algunos de ellos sufrieron infección por transmisión natural. La toma de muestra se llevó a cabo siguiendo una distribución espacial aleatoria, y luego estas muestras fueron analizadas por RT-qPCR y TAS-ELISA. La tabla 4 muestra los resultados de 44 plantas analizadas.

Diagnóstico por TAS-ELISA	Diagnóstico por RT-qPCR	Número de muestras/ muestras totales	Muestras sintomáticas/ total de muestras analizadas en el grupo
+	+	20/44	6/20
-	-	16/44	0/16
-	+	8/44	2/8
+	-	0/44	0

Tabla 4. Comparación del TAS-ELISA y RT-qPCR en muestras de campo infectadas por transmisión natural. TAS-ELISA (+) equivale a  $DO_i/DO_s \geq 3$ ; RT-qPCR (+) equivale a  $Ct \leq 30$ . Se expresa la fracción de muestras sobre el total que corresponde a cada resultado y la fracción de muestras que fueron sintomáticas dentro de cada grupo.

Treinta y seis de las muestras arrojaron resultados coincidentes por ambos métodos: 20 individuos fueron positivos para CPsV y 16 fueron negativos.

Dentro del grupo de las 20 muestras positivas, solo 6 de ellas presentaban síntomas típicos de psorosis al momento de la recolección, siendo asintomáticas las 14 restantes. La figura 5 muestra algunos de los síntomas encontrados al momento de la toma de muestra. Ninguna de las 16 muestras negativas presentó síntomas de psorosis. Las 8 muestras restantes no presentaron diagnósticos coincidentes: resultaron positivas por RT-qPCR, pero negativas por TAS-ELISA. Dos de ellas presentaban síntomas típicos de psorosis lo que conduce a la hipótesis de que sería la RT-qPCR la que aporta el diagnóstico acertado, y el TAS-ELISA arrojaría falsos negativos. Además, no se registró ningún caso de diagnóstico negativo por RT-qPCR y positivo por TAS-ELISA (tabla 4).



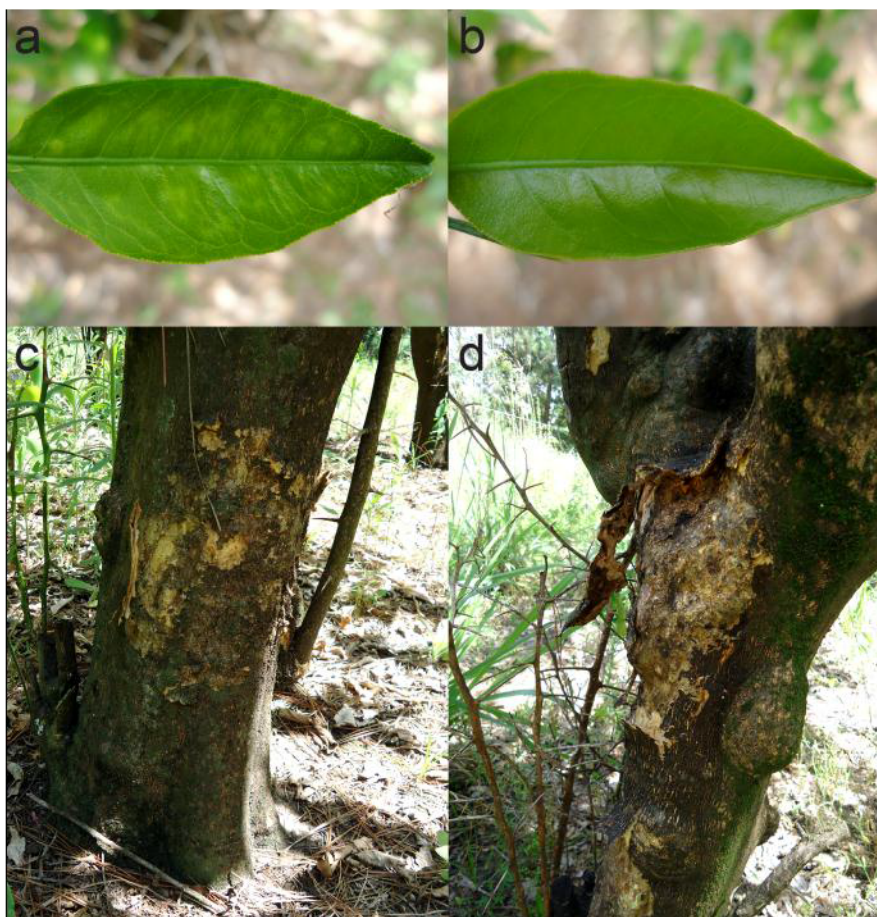


Figura 5. Síntomas de psorosis en naranjo dulce encontrados en el muestreo de campo (EEA INTA Concordia). a. Hoja con manchas y flecos cloróticos. b. Hoja asintomática. c. y d. Descascarados del tronco.

En el mismo lote (504) se realizó un nuevo ensayo para corroborar la dispersión natural de psorosis en plantas muy jóvenes, y se aplicó el protocolo de RT-qPCR. En este ensayo se colocó una bandeja conteniendo 100 plántulas de invernáculo de aproximadamente dos meses de edad cerca de los árboles infectados del lote, con el fin de ser sometidos a la difusión natural de psorosis. Luego de 6 meses de exposición fueron retornados al invernáculo para su análisis por TAS-ELISA en 10 grupos de 10 individuos cada uno. Nueve de esos grupos fueron francamente negativos por esta técnica, y un grupo arrojó un valor de TAS-ELISA por debajo del punto de corte pero cercano a él, sugiriendo que alguna de las plántulas del grupo podría ser positiva para CPsV. Entonces éste grupo de plantas se analizó por RT-qPCR resultando positivo. Al abrir el grupo de 10 individuos, 5 de ellos fueron positivos, y los otros 5 negativos. Este ensayo aporta evidencias experimentales sobre la dispersión natural de psorosis, además de indicar que la RT-qPCR desarrollada es capaz de detectar concentraciones de virus en estadios tempranos de la infección natural, probablemente en baja concentración.



## **F. Detección de fragmentos derivados del gen *cp* de CPsV en cítricos transgénicos**

El protocolo desarrollado aquí se aplicó para la cuantificación del mRNA-ihpCP y el mRNA-CP en las líneas transgénicas ihpCP y CP respectivamente como se mostró en otros capítulos de esta tesis. Pueden observarse las cuantificaciones del mRNA-ihpCP mediante este protocolo, en distintas condiciones y tejidos, en las figuras 5 y 9b del capítulo 1, las figuras 2, a y b del capítulo 2 y del mRNA-CP en la figura 12a del capítulo 1.

## **CONCLUSIONES**

- Se diseñaron los cebadores CP1c y CP3, y con ellos se desarrolló un protocolo de RT-qPCR que es específico para CPsV.
- Se estableció una correlación entre los valores de Ct y el número de copias cp, y para el gen de referencia ubiquitina. El límite de detección se estableció en Ct=30.
- Se comparó la sensibilidad de la RT-qPCR con la del TAS-ELISA, resultando mayor la del nuevo método.
- Se aplicó este método con éxito para la detección de diferentes aislamientos de CPsV.
- Se aplicó este método con éxito para la detección en muestras de campo.
- Se aplicó este método con éxito para la detección de fragmentos derivados del gen cp de CPsV en cítricos transgénicos.

## **DISCUSIÓN**

La RT-qPCR es actualmente el método más ampliamente usado para cuantificar cambios en la expresión génica, y para el diagnóstico (Bustin et al. 2009). CPsV había sido detectado por RT-qPCR previamente a este trabajo, usando sondas Taqman, aplicado con éxito en muestras de México y Europa (Barragán-Valencia et al. 2008; Loconsole et al. 2010), pero con pares de cebadores distintos, y sin comparar éste método con otros métodos de cuantificación y diagnóstico. En el presente trabajo se reporta por primera vez la aplicación de RT-qPCR como herramienta de diagnóstico en Argentina, aplicando un nuevo protocolo menos costoso, con SYBR Green y cebadores altamente específicos.

La detección de CPsV con esta técnica fue demostrada en un amplio rango de tipos de muestras, que incluyen distintos aislamientos de CPsV, provenientes de diferentes regiones geográficas, mostrando una variedad de síntomas y diferentes tipos de psorosis (PsA y PsB). También se alcanzó una detección exitosa en material asintomático y en muestras de campo de árboles adultos y de plántulas jóvenes naturalmente infectadas. En comparación con los métodos corrientes de cuantificación de virus, en su mayoría serológicos, la mayor ventaja de la RT-qPCR es su mayor sensibilidad, alcanzando la detección aún con cantidades limitadas de RNA. Al respecto, en este trabajo fue comparado el nuevo protocolo de RT-qPCR con el TAS-ELISA (Zanek et al. 2006), aplicado hasta entonces en varios países como el método más sensible y universal para la detección cuantitativa de CPsV. Este protocolo de RT-qPCR es más rápido, más confiable, y utiliza reactivos comerciales; mientras que el TAS-ELISA depende de la disponibilidad y la actividad de los sueros, ésta última pudiendo mermar con los años, y si se dispusiera de un nuevo suero, éste no necesariamente tendría la misma actividad que el anterior, y por ende, su eficiencia podría variar.

La RT-qPCR permitió detectar muestras infectadas con CPsV, presentando un variado título viral, desde 1 a 100 copias de cp/100 copias de ubiquitina. Además se ha demostrado una cuantificación eficiente del mRNA-ihpCP y el mRNA-CP en las plantas transgénicas, mostrada en los capítulos anteriores.

El límite de detección de la RT-qPCR fue establecido: para que una muestra sea considerada positiva debe arrojar un  $Ct \leq 30$ . En cambio el punto de corte para el TAS-ELISA suele dar lugar a interpretaciones ambiguas, e incluso varios de los laboratorios que utilizan el TAS-ELISA para la detección de CPsV consideran que el punto de corte es 2 (M. I. Plata, EEA INTA Concordia y M. Cambra, IVIA Valencia, España; comunicaciones personales). Alioto et al. (1999) analizando 119 muestras, estableció el punto de corte en 3, ya que en general se había encontrado con un grupo de muestras francamente positivas, y francamente negativas. Sin embargo, cuando Zanek (2006) aplicó el método a plantas transgénicas que expresaban bajas cantidades de proteína de cubierta, hubo valores de  $DO^i/DO^s$  entre 2 y 3, es decir, en un rango dudoso. En otros laboratorios, propusieron que el valor 2 fuera considerado como positivo, pero no se han hecho ni publicado trabajos que avanzaran en este punto con el TAS-ELISA, siendo una de sus debilidades.

En este trabajo se encontró concordancia en la detección de CPsV entre RT-qPCR y TAS-ELISA en todos los aislamientos de CPsV mantenidos en invernáculo, y en 36 de 44 muestras de campo. Se detectó CPsV por RT-qPCR en muestras que son negativas por TAS-ELISA. La determinación de falsos positivos y falsos negativos en un método diagnóstico requiere de un tratamiento estadístico con un mayor número de muestras (Basketter and Kimber 2007; Cronin and Vickers 2008), y con intervención de otros métodos, como es el caso del ensayo biológico. En ese sentido, hubo determinaciones realizadas en este trabajo de tesis, que fueron positivas por RT-qPCR y negativas por TAS-ELISA, que presentaban síntomas, lo que favorecería al primero y señalaría al segundo con falsos negativos.

La correlación entre la manifestación de síntomas y la detección por RT-qPCR aún no fue estudiada en detalle, pero se ve que todas las muestras sintomáticas fueron positivas por RT-qPCR, mientras que todas las muestras negativas fueron

asintomáticas. Sin embargo, existen muestras asintomáticas que fueron positivas por RT-qPCR, indicando que la manifestación de síntomas no es condición necesaria para que la presencia de CPsV sea detectada por RT-qPCR.

## **PERSPECTIVAS**

Para avanzar en el diagnóstico, sería necesario realizar una validación de la RT-qPCR, comparando el método con el TAS-ELISA, y con un tercer método, como el test biológico. Dicha validación es una de las metas hacia el futuro, para lograr una auténtica herramienta para el diagnóstico de psorosis en Argentina.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

- El transgén ihpCP presenta una expresión estable en el estado adulto de las líneas ihpCP-10 y -15, y en sus propagaciones sobre pie LR, tanto en hoja como en vareta. Dado que el gen *uidA* se expresa en todos los tejidos de la planta, en el estado adulto y en las propagaciones, y pertenece a la misma construcción y bajo su propio promotor 35S; puede inferirse que también la expresión del transgén ihpCP ocurriría en todos los tejidos.
- Los siRNA derivados del transgén ihpCP se expresan en forma estable en las plantas madres y propagaciones LR/ihpCP-10 y -15. Las especies de siRNA generadas corresponderían a las de 21 y 24 nt y se acumula mRNA-ihpCP, que se creía degradado por el mecanismo de silenciamiento génico.
- En las plantas generadas por doble *heterografting*, el mRNA-ihpCP o un fragmento del mismo, acumulado en el tejido ihpCP no se detecta en el pie LR de las plantas LR/ihpCP/NDP, pero sí en la copa NDP, presentando un gradiente de concentración que disminuye desde las hojas del puente hacia las hojas de la copa NDP. El hecho de haber sido detectado en vareta de la copa NDP, donde no hay síntesis de mRNA-ihpCP indica que éste se transporta a través del injerto, aunque no se acumula en las hojas de la copa. Se desconoce si éste mRNA posee alguna función, aunque podría proponerse como una de las señales del silenciamiento a larga distancia o que aporte al mismo como target.
- Los siRNA-ihpCP fueron detectados en hoja y vareta de los puentes ihpCP de las plantas LR/ihpCP/NDP, pero no se detectaron en el pie LR ni en la copa NDP. También se detectaron siRNA-ihpCP en las copas CP de las plantas LR/ihpCP/CP. Las especies acumuladas en este último caso podrían ser la sumatoria de los siRNA derivados del mRNA-CP de la copa, y/o del mRNA-ihpCP translocados desde el puente.
- Las copas CP injertadas sobre puente ihpCP-10 fueron silenciadas para el gen *cp*, confirmando que el silenciamiento génico establecido en el tejido ihpCP es capaz de moverse a través del injerto. Las señales de silenciamiento a larga distancia podrían ser los siRNA-ihpCP y/o el mRNA-ihpCP o un fragmento del mismo.
- Las líneas ihpCP-10 y -15 son puentes de una planta con doble *heterografting*, con copa CP o copa NDP, fueron resistentes a CPsV 90-1-1 en la primera brotación.
- La resistencia de las líneas ihpCP fue estable durante 2 años, siendo la línea ihpCP-15 la más eficiente. Sin embargo, el virus pudo movilizarse hacia el pie y



hacia la copa, ambos susceptibles, 2 años después de ser inoculado, demostrando que no se trata de una resistencia completa sino de una inhibición de la infección. El virus CPsV pudo permanecer latente en esas plantas, y en el nuevo tejido injertado se disparó su multiplicación.

- Las líneas ihpCP-10 y -15 propagadas, plantas LR/ihpCP, también fueron resistentes al aislamiento heterólogo y causante de psorosis B CPsV 189-34.
- Las copas NDP y CP injertadas sobre puente ihpCP y desafiadas en los puentes con CPsV 90-1-1 fueron resistentes durante la primera brotación. Se probó que la resistencia de las copas es debida a la transmisión del silenciamiento génico desde el puente ihpCP; aunque las mismas copas son susceptibles al virus si la inoculación precede al *heterografting*.

## REFERENCIAS

- Abou Kubaa, R., Saleh, S., Kumari, S., El Khateeb, A., & Djelouah, K. (2014). First Report of Citrus Psorosis Virus in Syria. *Journal of Plant Pathology*, 96(4), 116
- Agrios, G. (1996). Fitopatología. 2da Edición, Editorial Limusa, México
- Alioto, D., Guerri, J., Moreno, P., & Milne, R. G. (2007). Citrus psorosis virus. En: Rao, G. P., Myrta, A., & Ling, K. S. (eds.). Characterization, diagnosis and management of plant viruses, Vol. 2. Studium Press L. C., Houston, TX, USA
- Alioto, D., Malfitano, M., Troisi, A., Peluso, A., Martin, S., & Milne, R. G. (2003). Variability of the coat protein gene of Citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. *Arch Virol*, 148(11), 2155-2166
- Alioto, D., Gangemi, M., Deaglio, S., Sposato, S., Noris, E., Luisoni, E., & Milne, R. G. (1999). Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathology*, 48, 735-741
- Anderson, J. M., Palukaitis, P., & Zaitlin, M. (1992). A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci*, 89, 8759-8763
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., & Garcia, S. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev*, 24(9), 904-915
- Barragán-Valencia, G., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, M. G., Peña-del-Río, M. A., & Quintero-Zapata, I. (2008). Detección Cuantitativa del Virus Psorosis de Cítricos mediante RT-PCR Tiempo Real. *Agrociencia*, 42, 225-232
- Barthe, G. A., Ceccardi, T. L., Manjunath, K. L., & Derrick, K. S. (1998). Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *J Gen Virol*, 79(6), 1531-1537
- Basketter, D. A., & Kimber, I. (2007). Information derived from sensitization test methods: test sensitivity, false positives and false negatives. *Contact Dermatitis*, 56(1), 1-4
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 437(7006), 356-363
- Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 8 (10), 1833-1844
- Baulcombe, D. C. (1994). Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends Microbiol*, 2, 60-63
- Baurle, I., Smith, L., Baulcombe, D. C., & Dean, C. (2007). Widespread role for the flowering-time regulators FCA and FPA in RNA-mediated chromatin silencing. *Science*, 318(5847), 109-112
- Beñatena, H. N., & Portillo, M. M. (1984). Natural spread of Psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey, S. M., Timmer, L. W., Dodds, J. A. (eds). Proc 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 9-13 May 1983. Riverside, CA, USA, IOCV, p 159-164
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513-1523

- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., & Park, H. S. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res*, 34(21), 6233-6246
- Boava, L. P., Cristofani-Yaly, M., Mafra, V. S., Kubo, K., Kishi, L. T., Takita, M. A., Ribeiro-Alves, M., & Machado, M. A. (2011). Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics*, doi: 10.1186/1471-2164-12-39
- Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol*, 65, 473-503
- Boutet, S., Vazquez, F., Liu, J., Béclin, C., Fagard, M., Gratias, A., Morel, J. B., Crété, P., Chen, X., & Vaucheret, H. (2003). Arabidopsis HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Curr Biol*;13(10), 843-848
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88, 7-37
- Brodersen, P., & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet*, 22(5), 268-280
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., & Sieburth, L. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 320(5880), 1185-1190
- Brosnan, C. A., & Voinnet, O. (2011). Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. *Curr Opin Plant Biol*, 14(5),580-587
- Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M., & Carroll, B. J. (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(37), 14741-14746
- Buhtz, A., Springer, F., Chappell, L., Baulcombe, D. C., & Kehr, J. (2008). Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant J*, 53(5), 739-749
- Burgan, J. (2008). Role of silencing suppressor proteins. *Methods Mol Biol*, 451, 69-79
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55 (4) (Reviews)
- Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M. G., Simon, A. E., Morris, T. J., & Qu, F. (2010). The capsid protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in Arabidopsis. *J. Virol*, 84, 7793-7802
- Castañer, M. A. (2003). En: Producción de Agrios, Ediciones Mundi Prensa
- Cervera, M., Esteban, O., Gil, M., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Peña, L., & Cambra, M. (2010). Transgenic expression in citrus of single-chain antibody fragments specific to Citrus tristeza virus confers virus resistance. *Transgenic Res*, 19(6),1001-1015
- Cervera, M., Juárez, J. A., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila, N., Navarro, L. & Peña, L. (1998). Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res*, 7, 51-59
- CFI (Consejo Federal de Inversiones) Sistemas Productivos Regionales. (2014). Informe sector cítrico. <http://cfi.org.ar/nota/informe-de-la-actividad-citrica-en-la-argentina>

- CFI (Consejo Federal de Inversiones) Sistemas Productivos Regionales. (2013). Informe sector citrícola Julio 2013
- Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*, 8(11), 884-896
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V., & Carrington, J. C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, 18(10), 1179-1186
- Cheng, N. H., Su, C. L., Carter, S. A., & Nelson, R. S. (2010). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*, *Plant J*, 23, 349-362
- Costa, N., Plata, M. I., Ramos, F., Fernández, P., & Hauteville, C. (2013). Aerial spread of Citrus psorosis virus (CPsV) by insects in Argentina. In Proceedings of the 19th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 2013, Abstract, IOCV Conference, South Africa
- Costa, N., Plata, M. I., & Anderson, C. (2004). VIII-Capítulo 7: Plantas cítricas libres de enfermedades. En: Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. (Eds.) Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA, Buenos Aires. p 317-318
- Craig, W., Tepfer, M., Degrassi, G., & Ripandelli, D. (2008). An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica*, 164, 853-880
- Cronin, A. M., & Vickers, A. J. (2008). Statistical methods to correct for verification bias in diagnostic studies are inadequate when there are few false negatives: a simulation study. *BMC Med Res Methodol*, 8, 75
- Csorba, T., Pantaleo, V., & Burgyan, J. (2009). RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res*, 75, 35-71
- da Graça, J. V., Lee, R. F., Moreno, P., Civerolo, E. L., & Derrick, K. S. (1991). Comparison of citrus ringspot, psorosis, and other virus like agents of citrus. *Plant Dis*, 75, 613-616
- Danós, E. (1990). La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. En: International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Eds.), *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 22, 265-277
- Davidson, A., Keller, F., & Turgeon, R. (2011). Phloem loading, plant growth form, and climate. *Protoplasma*, 248, 153-163
- de Haan, P., Gielen, J. J., Prins, M., Wijkamp, I. G., van Schepen, A., & Peters, D. (1992). Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. *Biotechnology (N Y)*, 10(10), 1133-1137
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 313, 68-71
- Derrick, K. S., Bransky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W. & Nguyen, T. K. (1988). Two components associated with the citrus ringspot virus. En: Proc. 10 th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, USA. p 340-342
- Derrien, B., Baumberger, N., Schepetilnikov, M., Viotti, C., De Cillia, J., & Ziegler-Graff, V. (2012). Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39), 15942-15946
- Derrick, K. S., Lee, R. F., Hewitt, B. G., Barthe, G. A., & da Graca, V. (1991). Characterization of citrus ringspot virus, p. 386-390. In: Proc 11th Conf IOCV, Riverside



- Derrick, K. S., & Timmer, L. W. (2000). Citrus Blight and Other Diseases of Recalcitrant Etiology. *Annu Rev Phytopathol*, 38, 181-205
- Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W. X., & Ding, S. W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell*, 19(6), 2053-2063
- Ding, S. W., & Voinnet, O. (2009). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, 130(3), 413-426
- Ding, S. W., Li, H., Lu, R., Li, F., & Li, W. X. (2004). RNA silencing: a conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Res*, 102(1), 109-115
- Ding, X. S., Carter, S. A., Deom, C. M., & Nelson, R. S. (1998). Tobamovirus and Potyvirus accumulation in minor veins of inoculated leaves from representatives of Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiol*, 116, 125-136
- Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K. F., Aranda, M. A., & Llave, C. (2009). Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 392(2), 203-214
- Duan, C. G., Fang, Y. Y., Zhou, B. J., Zhao, J. H., Hou, W. N., & Zhu, H. (2012). Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell*, 24(1), 259-274
- Dunoyer, P., Brosnan, C. A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., et al. (2010a). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J*, 29(10), 1699-1712
- Dunoyer, P., Himber, C., Ruiz-Ferrer, V., Alioua, A., & Voinnet, O. (2007). Intra- and intercellular RNA interference in Arabidopsis thaliana requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nat Genet*, 39(7), 848-856
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., et al. (2010b). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 328(5980), 912-916
- Duran-Vila, N., & Moreno, P. (2000). Enfermedades de los cítricos. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España, p 165
- Fang, Y., & Spector, D. L. (2007). Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living Arabidopsis plants. *Curr Biol*, 17(9), 818-823
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2003). Exámen de los problemas fitosanitarios actuales relacionados con los cítricos y de las políticas aplicadas para combatirlos. Grupo Intergubernamental sobre frutos cítricos.
- Fawcett, H. S., & Cochran, L. C. (1942). Symptom expression of psorosis as related to kind of inoculum. *Phytopathology*, 32, 22
- Fawcett, H. S. (1932). New angles on treatment of bark diseases of citrus. *Calif. Citograph*, 17, 406-408
- Fawcett, H. S., & Klotz, L. J. (1938). Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology* 32, 22
- FEDERCITRUS. (2013). La Actividad Citrícola Argentina 2013. Federación Argentina del Citrus. <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2013.pdf>
- FEDERCITRUS. (2014). La Actividad Citrícola Argentina 2014. Federación Argentina del Citrus. <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act%20Citricola%2014.pdf>

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811
- Fisher, D. B. (2000). Long-distance transport. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 730-784
- Flachowsky, H., Trankner, C., Szankowski, I., Waidmann, S., Hanke, M. V., Treutter, D., et al. (2012). RNA-Mediated Gene Silencing Signals are not Graft Transmissible from the Rootstock to the Scion in Greenhouse-Grown Apple Plants *Malus sp.* *Int J Mol Sci*, 13(8), 9992-10009
- Flores, R., Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sánchez-Navarro, J., Fagoaga, C., López, C., Navarro, L., Moreno, P., & Peña, L. (2013). Citrus tristeza virus p23: a unique protein mediating key virus–host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 4(98), doi: 10.3389/fmicb.2013.00098
- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Shilts, T., Folimonov, A. S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., & Dawson, W. O. (2010). Infection with strains of Citrus tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus. *Journal of Virology*, 84, 1314-1325
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y., & Watanabe, Y. (2007). Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, 48(9), 1243-1253
- Furman, N., Kobayashi, K., Zaneck, M. C., Calcagno, J., Garcia, M. L., & Mentaberry, A. (2013). Transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. *Journal of Biotechnology*, 167, 412-419
- García, M. L. (2012). Ophioviruses: State of the Art. En: García, M. L., & Romanowski V (eds.). *Viral Genomes: Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions*. intechwebweb.org, Rijeka, Croacia
- García, M. L., Sánchez de la Torre, M. E., Dal Bo, E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R. G. & Grau, O. (1997) Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology*, 46, 830-836
- Garcia, M. L., Dal Bo, E., Grau, O., & Milne, R. G. (1994). The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol*, 75 (Pt 12), 3585-3590
- Garcia, M. L., Grau, O., & Sarachu, A. N. (1991a). Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Res Virol*, 142(4), 303-311
- Garcia, M. L., Costa, N. B., Casafús, C. M. & Sarachu, A. N. (1991b). Evaluation of different citrus as psorosis indicators and as psorosis propagation hosts. In: Proc. of the 11th Conf. of IOCV. IOCV, Riverside, California, USA
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., & Brempelis, K. J. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell*, 22(2), 481-496
- Garnsey, S. M., & Timmer, L. W. (1988). Local lesion isolate of ringspot virus induces psorosis barkscaling. En: Proc. 10 th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, California, USA. p. 334-339
- Ghazal, S. A., El-DougDoug Kh, A., Mousa, A. A., Fahmy, H., & Sofy, A. R. (2008). Isolation and identification of citrus psorosis virus Egyptian isolate (CPsV-EG). *Commun Agric Appl Biol Sci*, 73(2), 285-295
- Goldschmidt, E. E. (2013). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Front Plant Sci*, 17(5), 727

- González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P. Carr, J. P., Kalinina, M., & Canto, T. (2012). RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA*, 18, 771-782
- Gottwald, T. R., Palle, S. R., Miao, H., Seyran, M., Skaria, M., & da Graca, J. V. (2005). Assessment of the possibility of natural spread of Citrus Psorosis disease. In: Hilf ME, Duran-Vila M, Rocha-Peña MA. (eds) Proc 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 3-6 November 2004. Riverside, CA, USA, IOCV, p 240-250
- Gottwald, T. R. (2000). Citrus canker. *The Plant Health Instructor. Plant Disease Lessons*
- Guerri, J. (1999). Psoriasis. In: Durán-Vila, N., Moreno, P. (eds.). Enfermedades de los cítricos. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa
- Guo, H. S., & Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J*, 21(3), 398-407
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286(5441), 950-952
- Harada, T. (2010). Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. *Scientia Horticulturae*, 125, 545-550
- Haroldsen, V. M., Chi-Ham, C. L., Bennett, A. B. (2012). Transgene mobilization and regulatory uncertainty for non-GE fruit products of transgenic rootstocks. *J Biotechnol*, 161(3), 349-353
- Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., & Burgyan, J. (2003). In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol*, 77(10), 6082-6086
- Haywood, V., Yu, T. S., Huang, N. C., & Lucas, W. J. (2005). Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J*, 42(1), 49-68
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., & Green, P. J. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet*, 38(6), 721-725
- Hewezi, T., Alibert, G., & Kallerhoff, J. (2005). Local infiltration of high- and low-molecular-weight RNA from silenced sunflower (*Helianthus annuus L.*) plants triggers post-transcriptional gene silencing in non-silenced plants. *Plant Biotechnol J*, 3(1), 81-89
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., & Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J*, 22(17), 4523-4533
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci*, 4, 154
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. Academic Press, San Diego, CA, p 1001
- Iglesias, N. G., Gago-Zachert, S. P., Robledo, G., Costa, N., Plata, M. I., & Vera, O. (2008). Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. *Virus Genes*, 36(1), 199-207
- Ilardi, V., & Nicola-Negri, E. D. (2011). Genetically engineered resistance to Plum pox virus infection in herbaceous and stone fruit hosts. *GM Crops*, 2(1), 24-33
- Incarbone, M., & Dunoyer, P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci*, 18(7), 382-392



- Iracheta-Cárdenas, M. M., Orona-Castro, F., Almeyda-León, I. H., & Rocha-Peña, M. A. (2004). Ocurrencia y Distribución de Psorosis de los Cítricos en el Estado de Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 299-307
- Ito, T., Furuta, T., & Namba, N. (2011). First report of Citrus psorosis virus in Japan. *J Gen Plant Pathol*, 77, 257-259
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathiou, T., Li, S., Satoh, M., & Hamel, J. C. (2005). Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat Cell Biol*, 7(12), 1267-1274
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329
- Jorgensen, R. A. (2002). RNA traffics information systemically in plants. *PNAS*, 99(18), 11561-11563
- Kalantidis, K. (2004). Grafting the way to the systemic silencing signal in plants. *PLoS Biol*, 2(8), E224
- Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., & Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol Cell*, 100(1), 13-26
- Kalantidis, K., Tsagris, M., & Tabler, M. (2006). Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in *Nicotiana benthamiana* is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *Plant J*, 45(6), 1006-1016
- Kasai, A., Bai, S., Li, T., & Harada, T. (2011). Graft-transmitted siRNA signal from the root induces visual manifestation of endogenous post-transcriptional gene silencing in the scion. *PLoS One*, 6(2), e16895
- Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 225-246
- Kayim, M. (2010). Biological and molecular detection of Citrus Psorosis Virus in Citrus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *J Plant Biochem Biot*, 19, 259-262
- Kehr, J., & Buhtz, A. (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot*, 59(1), 85-92
- Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*, 95(7), 1017-1026
- Kormelink, R., Garcia, M L, Goodin, M, Sasaya, T, Haenni, A L. (2011). Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res*, 162(1-2), 184-202
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*, 54(4), 391-406
- Kumagai, M. H., Donson, J., della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., & Grill, L. K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5), 1679-1683
- Kundu, J. K., Briard, P., Hily, J. M., Ravelonandro, M., & Scorza, R. (2008). Role of the 25-26 nt siRNA in the resistance of transgenic *Prunus domestica* graft inoculated with plum pox virus. *Virus Genes*, 36(1), 215-220
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., & Liu, Y. P. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J*, 25(12), 2768-2780
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., & Burgyn, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J*, 23(4), 876-884



- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W. J., & Beachy, R. N. (1993). A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J*, 4, 959-970
- Larocca, L. H. (1985). La citricultura en la provincia de Entre Ríos. En: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), eds., Actas de la XVI, Jornadas Técnicas de Citricultura, p 42-51
- Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*, 11(3), 204-220
- Legarreta, G. G., Garcia, M. L., Costa, N., & Grau, O. (2000). A highly sensitive heminested RT-PCR assay for the detection of citrus psorosis virus targeted to a conserved region of the genome. *J Virol Methods*, 84(1), 15-22
- Lemgo, G. M. Y., Sabbadini, S., Pandolfini, T., & Mezzetti, B. (2013). Biosafety considerations of RNAi-mediated virus resistance in fruit-tree cultivars and in rootstock. *Transgenic Res*, DOI 10.1007/s11248-013-9728-1
- Levy, L. & Gumpf, J. (1991). Studies on the psorosis disease of citrus and preliminar characterization of a flexuous virus associated with the disease, p. 319-336. In: Proc. 11th Conf. IOCV, Riverside, CA, USA
- Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T. C., Hanke, V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hofmann, T., & Szankowski, I. (2007). Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta*, 226(5), 1243-1254
- Li, F., & Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol*, 60, 503-531
- Lin, L., Li, R., Bateman, M., Mock, R., & Kinard, G. (2013). Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *Eur J Plant Pathol*, 137, 797-804
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M., & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell*, 5(12), 1749-1759
- Liu, Q., Feng, Y., & Zhu, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Funct Integr Genomics*, 9(3), 277-286
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723
- Loconsole, G., Saponari, M., & Savino, V. (2010). Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *Eur J Plant Pathol*, 128, 251-259
- Lomonosoff, G. P. (1995). Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 33, 323-343
- Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R. G., & Roggero, P. (2002). Transmission by *Olipidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and Their Roles in Lettuce Big-Vein Etiology. *Phytopathology*, 92(3), 288-293
- Lough, T. J., & Lucas, W. J. (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 203-232

- Lu, K. J., Huang, N. C., Liu, Y. S., Lu, C. A., & Yu, T. S. (2012). Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. *RNA Biol*, 9(5), 653-662
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., & Dawson, W. O. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15742-15747
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., & Li, W. X. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 436(7053), 1040-1043
- Ma, X., Nicole, M. C., Meteignier, L. V., Hong, N., Wang, G., & Moffett, P. (2014). Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *J Exp Bot*, doi:eru447
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell*, 22(12), 3879-3889
- Mallory, A. C., Mlotshwa, S., Bowman, L. H., & Vance, V. B. (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J*, 35(1), 82-92
- Manzano, D., Marquardt, S., Jones, A. M., Baurle, I., Liu, F., & Dean, C. (2009). Altered interactions within FY/AtCPSF complexes required for Arabidopsis FCA-mediated chromatin silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8772-8777
- Martin, S., Garcia, M. L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., & Grau, O. (2006). Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J Gen Virol*, 87(Pt 10), 3097-3102
- Martin, S., Alioto, D., Milne, R. G., Garnsey, S. M., García, M. L., Grau, O., Guerri, J., & Moreno, P. (2004). Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 747-757
- Martin, S., Alioto, D., Milne, R. G., Guerri, J., & Moreno, P. (2002). Detection of citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathol*, 51, 134-141
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431(7006), 343-349
- Mekuria, T., Bamunusinghe, D., Payton, M., & Verchot-Lubicz, J. (2008). Phloem unloading of potato virus X movement proteins is regulated by virus and host factors. *Mol Plant Microbe Interact*, 21(8), 1106-1117
- Melnyk, C. W., Molnar, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J*, 30(17), 3553-3563
- Milne, R. G., García, M. L. & Grau, O. (2000). Virus Taxonomy. Sevent Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press. van Regenmortel, M.V.H., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., Mc Geoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. p 627-631
- Minicka, J., Rymelska, N., Elena, S. F., Czerwoniec, A., & Hasiów-Jaroszewska, B. (2015). Molecular evolution of Pepino mosaic virus during long-term passaging in different hosts and its impact on virus virulence. *Ann Appl Biol*, DOI: 10.1111/aab.12179
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J., Peragine, A., Endres, M. W., Li, J., Chen, X., Poethig, R. S., Bowman, L. H., Vance, V. (2008). DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS One*, 3(3), e1755

- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., & Baulcombe, D. C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328(5980), 872-875
- Moore, G. A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends Genet*, 17(9), 536-540
- Moreno, P., & Roistacher, C. N. (1990). Las enfermedades de los citrus transmisibles por injerto: una puesta al día. Tristeza. *Phytoma* 20, 29-37
- Napoli, C., Lemieux, C., & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2(4), 279-289
- Naum-Ongania, G., Gago-Zachert, S., Peña, E., Grau, O., & Garcia, M. L. (2003). Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res*, 96(1-2), 49-61
- Navarro, L. (2012). The spanish Citrus Industry. Proc XII International Citrus Congress, Valencia, España, Plenary Conference, 1
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., & Estelle, M. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439
- Navarro, L., Pina, J. A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J. F., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Zaragoza, S., & Medina, A. (2002). The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2001. In "Proc. 15th Conf. International Organization of Citrus Virologists". IOCV, Riverside, CA, USA
- Navarro, L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno, P., da Graça, J. V., Timmer, L. W. (eds.). Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA, p 383-391
- Navarro, L., Juárez, J., Ballester, J. F., & Pina, J. A. (1980). Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms by shoot-tip grafting *in vitro*. En: Proc. 8th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, USA. p 162-166
- Navas-Castillo, J., & Moreno, P. (1993). Partial purification of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. *Plant Pathol.* 42, 339-346
- Nicolisi, E. (2007). Origin and Taxonomy. In: Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology, Kahn, I. A. (Ed.) [www.cabi.org](http://www.cabi.org)
- Niehl, A., & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*, 248(1), 75-99
- Ortin, J., & Parra, F. (2006). Structure and function of RNA replication. *Annu Rev Microbiol*, 60, 305-326
- Palukaitis, P., & Zaitlin, M. (1997). Replicase-mediated resistance to plant virus diseases. *Adv. Virus Res*, 48, 349-377
- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J*, 16(15), 4738-4745
- Palauqui, J. C., & Vaucheret, H. (1998). Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9675-9680
- Pall, G. S., & Hamilton, A. J. (2008). Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc*, 3(6), 1077-1084



- Pallas, V., & Gomez, G. (2013). Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Front Plant Sci*, 4, 130
- Palle, S. R., Miao, H., Seyran, M., Louzada, E. S., da Graça, J. V., & Skaria, M. (2004). Preliminary Evidence for Natural Transmission of Citrus psorosis virus by an Olpidium-Like Fungus. En: 16th Conf. of the IOCV, 2004. Abstract. IOCV Conference, Mexico
- Pantaleo, V. (2011). Plant RNA silencing in viral defence. *Adv Exp Med Biol*, 722, 39-58
- Peleg, G., Malter, D., & Wolf, S. (2007). Viral infection enables phloem loading of GFP and long-distance trafficking of the protein. *Plant J*, 51(2), 165-172
- Peña, E. J., Robles Luna, G., Zaneck, M. C., Borniego, M. B., Reyes, C. A., Heinlein, M., & Garcia, M. L. (2012). Citrus psorosis and Mirafiori lettuce big-vein ophiovirus coat proteins localize to the cytoplasm and self interact in vivo. *Virus Res*, 170(1-2), 34-43
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pina, J. A., Durán-Vila N., & Navarro L. (1995). Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 14(10), 616-619
- Petri, C., & Burgos, L. (2005). Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect?. *Transgenic Res*, 14, 15-26
- Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Zoller, T., Cougot, N., & Basyuk, E. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309(5740), 1573-1576
- Pomeranz, M., Lin, P. C., Finer, J., & Jang, J. C. (2010). AtTZF gene family localizes to cytoplasmic foci. *Plant Signal Behav*, 5(2), 190-192
- Poogin, M. M. (2013). How Can Plant DNA Viruses Evade siRNA-Directed DNA Methylation and Silencing?. *Int J Mol Sci*, 14, 15233-15259
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., & Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol Plant Pathol*, 9(1), 73-83
- Pujol, A. R., & Beñatena, H. N. (1965). Study of psorosis in Concordia, Argentina. En: Proc. of the 3rd Conf. of IOCV. IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, p 170-174
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol*, 11, 745-760
- Qu, F. (2010). Antiviral role of plant-encoded RNA-dependent RNA polymerases revisited with deep sequencing of small interfering RNAs of virus origin. *Mol Plant Microbe Interact*, 23(10), 1248-1252
- Qu, F., Ye, X., & Morris, T. J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci*, 105(38), 14732-14737
- Raja, P., Sanville, B.C., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2008). Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J virol*, 82(18), 8997-9007
- Rajamäki, M. L., & Valkonen, J. P. T. (2002). Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 15, 138-149
- Reyes, C. A., Ocolotobiche, E. E., Marmisolé, F. E., Robles Luna, G., Borniego, M. B., Bazzini, A. A., Asurmendi, S., & García, M. L. (2015). Citrus psorosis virus infection alters processing, accumulation and function of citrus miR156. *Mol Plant Pathol*, aceptado para su publicación.



- Reyes, C. A., De Francesco, A., Peña, E. J., Costa, N., Plata, M. I., Sendin, L., Castagnaro, A. P., & García, M. L. (2011a). Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein–RNA silencing. *Journal of Biotechnology*, 151, 151-158
- Reyes, C. A., Zaneck, M. C., Velázquez, K., Costa, N., Plata, M. I., & García, M. L. (2011b). Generation of Sweet Orange Transgenic Lines and Evaluation of Citrus psorosis virus-derived Resistance against Psorosis A and Psorosis B. *Journal of Phytopathology*, 159, 531-537
- Reyes, C. A. (2009). Estudio del mecanismo de silenciamiento génico post transcripcional en plantas de nicotiana benthamiana y Citrus sinensis y su aplicación para la inducción de resistencia al virus de la psorosis de los cítricos. Tesis doctoral. Fac. Cs. Exactas. UNLP
- Reyes, C. A., Peña, E. J., Zaneck, M. C., Sanchez, D. V., Grau, O., & García, M. L. (2009). Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. *Plant Cell Rep*, 28(12), 1817-1825
- Roberts, A. G., Santa Cruz, S., Roberts, I. M., Prior, D. A. M., Turgeon, R., & Oparka, K. J. (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell*, 9, 1381-1396
- Robles Luna, G., Peña, E. J., Borniego, M. B., Heinlein, M., & García, M. L. (2013). Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology*, 441(2), 152-161
- Rodriguez-Negrete, E. A., Carrillo-Tripp, J., & Rivera-Bustamante, R. F. (2009). RNA silencing against geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J Virol*, 83(3), 1332-1340
- Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 25(7), 2383-2399
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A. M., Accotto, G. P., Masenga, V., & Milne, R. G. (2000). An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Arch Virol*, 145(12), 2629-2642
- Roistacher, C. N., D'Onghia, A. M., & Djelouah, K. (2000). Other viruses: Defining psorosis by biological indexing and ELISA. In: da Graca, J. V., Lee, R. F., Yokomi, R. K. (eds.). Proc 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 13-18 September 1998. Riverside, CA, USA, IOCV, p 144-151
- Roistacher, C. N. (1993). Psorosis- a review. In: Moreno, P., da Graca, J. V., Timmer, L. W. (eds.). Proc 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 23-27 November 1992. Riverside, CA, USA, p 139-154
- Roistacher, C. N. (1991). Psorosis complex: psorosis-A, psorosis-B and ringspot. In: International Organization of Citrus Virologists. (ed) Graft-Transmissible Diseases of Citrus, Handbook for Detection and Diagnosis. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p 115-126
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1998). Inhibition and maintenance of virus-induced gene silencing. *The plant cell*, 10(6), 937-946
- Ruiz-Ruiz, S., Navarro, B., Gisel, A., Peña, L., Navarro, L., Moreno, P., Di Serio, F., & Flores, R. (2011). Citrus tristeza virus infection induces the accumulation of viral small RNAs (21-24-nt) mapping preferentially at the 3'-terminal region of the genomic RNA and affects the host small RNA profile. *Plant Mol Biol*, 75(6), 607-619

- Sánchez de la Torre, M. E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O., & García, M. L. (1998). The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Molecular Plant Pathology Online* [<http://www.bspp.org.uk/mppol>] 1998/1019sanchez
- Sanford, J. C., & Johnson, S. A. (1985). The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol*, 113, 395-405
- Sansregret, R., Dufour, V., Langlois, M., Daayf, F., Dunoyer, P., Voinnet, O., & Bouarab, K. (2013). Extreme Resistance as a Host Counter-counter Defense against Viral Suppression of RNA Silencing. *PLOS pathogens*, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003435
- Saponari, M., Loconsole, G., Liao, H. H., Jiang, B., Savino, V., & Yokomi, R. K. (2013). Validation of high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *J Virol Methods*, 193(2), 478-486
- Schott, G., Mari-Ordonez, A., Himber, C., Alioua, A., Voinnet, O., & Dunoyer, P. (2012). Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J*, 31(11), 2553-2565
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., & Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol*, 138(4), 1842-1852
- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyan, J., & Behrens, S. E. (2013). AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Res*, 41(9), 5090-5103
- Searle, I. R., Pontes, O., Melnyk, C. W., Smith, L. M., & Baulcombe, D. C. (2010). JMJ14, a JmjC domain protein, is required for RNA silencing and cell-to-cell movement of an RNA silencing signal in Arabidopsis. *Genes Dev*, 24(10), 986-991
- Sen, G. L., & Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7(6), 633-636
- Shaharuddin, N. A., Han, Y., Li, H., & Grierson, D. (2006). The mechanism of graft transmission of sense and antisense gene silencing in tomato plants. *FEBS Lett*, 580(28-29), 6579-6586
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., & Nurnberger, T. (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe*, 4(1), 17-27
- Smith, L. M., Pontes, O., Searle, I., Yelina, N., Yousafzai, F. K., & Herr, A. J. (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(5), 1507-1521
- Smith, L. M., & Baulcombe, D. C. (2007). Dissection of silencing signal movement in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*, 2(6), 501-502
- Soler, N., Plomer, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2012). Transformation of Mexican lime with an intron-hairpin construct expressing untranslatable versions of the genes coding for the three silencing suppressors of Citrus tristeza virus confers complete resistance to the virus. *Plant Biotechnol J*, 10(5), 597-608
- Spiegelman, Z., Golan, G., & Wolf, S. (2013). Don't kill the messenger: long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci*, 213, 1-8
- Stoltz, L. P., & Strang, J. (2005). Reproducing Fruit Trees by Graftage: Budding and Grafting. *Cooperative Extension Service, University of Kentucky, College of Agriculture*, 39, 1-7

- Sunilkumar, G., Mohr, L., Lopata-Finch, E., Emani, C., & Rathore, K. S. (2002). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol Biol*, 50(3), 463-74
- Swingle, W. T., & Webber, H. J. (1896). The principal diseases of citrus fruits in Florida. USDA Div. Veg. Physiol. Pathol. Bull, 8
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol*, 49(4), 493-500
- Timmer, L. W. (2002). Plagas Y Enfermedades de Los Cítricos. Ediciones Mundi-Prensa
- Tournier, B., Tabler, M., & Kalantidis, K. (2006). Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant J*, 47(3), 383-394
- Tretter, E. M., Alvarez, J. P., Eshed, Y., & Bowman, J. L. (2008). Activity range of Arabidopsis small RNAs derived from different biogenesis pathways. *Plant Physiol*, 147(1), 58-62
- Turgeon, R. (1989). The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 40, 119-138
- Valkonen, J. P. T., & Somersalo, S. (1996). Patterns and barriers of cell-to-cell movement and lack of systemic spread of tobacco etch potyvirus (TEV-GUS) in *Solanum brevidens*. *Plant Sci*, 113, 221-228
- van Bel, A.J.E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ*, 26, 125-149
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2(4), 291-299
- Varallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J., & Havelda, Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J*, 29(20), 3507-3519
- Velázquez, K., Pina, J. A., Navarro, L., Moreno, P., & Guerri, J. (2012). Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the Citrus psorosis virus RNA 2. *Plant Pathology*, 61, 448-456
- Velázquez, K., Renovell, A., Comellas, M., Serra, P., Garcia, M. L., Pina, J. A., Navarro, L., Moreno, P. & Guerri, J. (2010). Effect of temperature on RNA silencing of a negative stranded RNA plant virus: Citrus psorosis virus. *Plant pathology*, 59, 982-990
- Velázquez, K., Perez, J. M., Alonso, M., Batista, L., Rodriguez, J., Legarreta, G., Grau, O., & García, M. L. (2005). Detection of Citrus psorosis virus in Cuba. In: Hilf, M. E., Duran-Vila, M., Rocha-Peña, M. A. (eds). *Proc 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 3-6 November 2004. Riverside, CA, USA, IOCV (Short Communications)
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 136(4), 669-687
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci*, 96(24), 14147-14152
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95(2), 177-187
- Voinnet, O., & Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature*, 389(6651), 553



- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., & Valkonen, J. P. (2011). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants?. *Plant Sci*, 181(4), 355-363
- Wallace, J. M. (1978). Virus and virus like diseases. In: Reuther, W., Calavan, E. C., Carman, G. W. (eds.). *The Citrus Industry*, Vol 4, Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Richmond, p 67-184
- Wallace, J. M., & Drake, R. J. (1968). Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. En: Proc. 4th Conf. IOCV. Univ. Florida Press, Gainesville. p 177-183
- Wallace, J.M. (1957). Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. *Hilgardia*, 27, 223-246
- Wang, N., & Trivedi, P. (2013). Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, 103(7), 652-665
- Wang, X. B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W. X., Chen, X., Yu, J. L., & Ding, S. W. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, 107(1), 484-489
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338
- Wintermantel, W. M., Banerjee, N., Oliver, J. C., Paolillo, D., & Zaitlin, M. (1997). *Cucumber mosaic virus* is restricted from entering minor veins of transgenic tobacco exhibiting replicase mediated resistance. *Virology*, 231, 248-257
- Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., & Carrington, J. C. (2005). Expression of Arabidopsis miRNA genes. *Plant Physiol*, 138(4), 2145-2154
- Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell*, 18(12), 3386-3398
- Yadav, R. K., & Chattopadhyay, D. (2011). Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a geminivirus. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(10), 1189-1197
- Yoo, B. C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y. M., et al. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16(8), 1979-2000
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward, R., & Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711), 932-935
- Zanek, M. C., Reyes, C. A., Cervera, M., Peña, E. J., Velazquez, K., Costa, N., Plata, M. I., Grau, O., Peña, L., & García, M. L. (2008). Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Report*, 27, 57-66
- Zanek, M. C. (2007). Resistencia derivada del patógeno aplicada al virus de la psorosis de los cítricos. Estudio de la expresión y localización intracelular de la proteína de cubierta viral. Tesis doctoral. Fac. Cs. Exactas. UNLP
- Zanek, M. C., Peña, E., Reyes, C. A., Figueroa, J., Stein, B., & Grau, O. (2006). Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods*, 137(2), 245-251
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2006). *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev*, 20(23), 3255-3268



- Zhao, D., & Song, G. Q. (2014a). Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant Biotechnol J*, 12(9), 1319-1328
- Zhao, D., & Song, G. Q. (2014b). High-throughput sequencing as an effective approach in profiling small RNAs derived from a hairpin RNA expression vector in woody plants. *Plant Sci*, 228, 39-47
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., & Felix, G.(2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428(6984), 764-767

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- **De Francesco, A.**, Costa, N., Plata, M.I., García, M.L. (2015). Improved detection of Citrus psorosis virus and coat protein-derived transgenes in citrus plants: comparison between real-time RT-PCR and TAS-ELISA. *Journal of Phytopathology*. En prensa.
- Ben Guerrero, E., **De Francesco, A.**, Garcia, M.L., Balatti, P.A., Dal Bó. E. (2013). First Report of Tomato rugose yellow leaf curl virus Infecting Tomato in Argentina. *Plant Disease*, 97 (12), 1662.
- Reyes, C.A., **De Francesco, A.**, Peña, E.J., Costa, N., Plata, M.I., Sendin, L., Castagnaro, A.P., Garcia, M.L. (2011). Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 151-158.



**Improved detection of Citrus psorosis virus and coat  
protein-derived transgenes in citrus plants: comparison  
between RT-qPCR and TAS-ELISA**

Journal:	<i>Journal of Phytopathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	De Francesco, Agustina; Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Costa, Norma; INTA, EEA Concordia Plata, María; INTA, EEA Concordia García, María; Instituto de Biotecnología y Biología Molecular,
Keywords:	Citrus psorosis virus, diagnosis, RT-qPCR, TAS-ELISA, transgenic citrus



1  
2  
3 1 Heading: High sensitive RT-qPCR detecting CPsV. *Instituto de Biotecnología y Biología*  
4  
5 2 *Molecular, CCT-La Plata, CONICET - UNLP.*  
6  
7  
8 3  
9

10 4 **Improved detection of *Citrus psorosis virus* and coat protein-derived transgenes in**  
11  
12 5 **citrus plants: comparison between RT-qPCR and TAS-ELISA**  
13  
14 6  
15  
16

17 7 Agustina De Francesco <sup>1</sup>, Norma Costa <sup>2</sup>, María I. Plata <sup>2</sup> and Maria L. García <sup>1</sup>  
18

19  
20 8 <sup>1</sup> Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET - UNLP, La  
21  
22 9 Plata, Argentina.  
23

24 10 <sup>2</sup> Estación Experimental Agropecuaria Concordia (EEA-Concordia), INTA, Entre Ríos,  
25  
26 11 Argentina.  
27  
28  
29 12

30  
31 13 Correspondence: Maria L. Garcia, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-  
32  
33 14 La Plata, CONICET - UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Email:  
34  
35 15 garcia\_m@biol.unlp.edu.ar  
36  
37  
38 16  
39  
40

41 17 **Keywords**

42  
43 18 Citrus psorosis virus; transgenic citrus; RT-qPCR; TAS-ELISA; diagnosis.  
44  
45  
46 19  
47  
48 20  
49

50 21 **Abstract**  
51  
52 22  
53  
54

55 23 Citrus is one of the most economically important fruit crops in the world. Citrus psorosis is  
56  
57 24 a serious disease mainly affecting oranges and mandarins in Argentina and Uruguay. The  
58  
59  
60

causal agent is *Citrus psorosis virus* (CPsV), an ophiovirus with a tripartite ssRNA genome of negative polarity. The coat protein (CP), the most abundant viral protein in infected plants, has been used to detect CPsV by TAS-ELISA, but only the biological indexing, taking one year long, is the current and validated technique for diagnosis of citrus psorosis. In the current study, a SYBR Green RT-qPCR protocol was developed, with primers designed to the most conserved region of the cp gene. We tested their specificity and sensitivity in comparison to TAS-ELISA. This RT-qPCR was applied successfully to field samples from Argentina, to a variety of isolates from different countries maintained in the greenhouse, to young seedlings and old trees from a psorosis natural transmission plot, and to transgenic citrus expressing the cp gene of CPsV or a fragment thereof. This method allowed accurate quantification of viral titer and cp gene expression in transgenic plants, which could not be detected before. The sensitivity and reliability of quantitative CPsV detection was improved with greater speed using commercial reagents and the sensitivity was three orders of magnitude higher than that of TAS-ELISA. All these data encourage its validation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Introduction**

Citrus is one of the most important fruit crops in Argentina and this country is one of the leaders in citrus exports, mainly lemons. Citrus plants are produced in two regions located in the Northeast (NE) and Northwest (NW) of Argentina, each with different climate and cultivars, with oranges and mandarins being the most important cultivars in the NE and grapefruit and lemon in the NW. All citrus species and citrus relatives used as rootstock are affected by citrus psorosis, one of the oldest viral and graft-transmissible diseases (Fawcett 1932). Psorosis was a serious disease in many countries for several decades (Roistacher 1993). Although eradicated in Europe, it is still important in Argentina and Uruguay, due to its natural spread by an unidentified vector (Beñatena and Portillo 1984), in Texas, USA (Gottwald et al. 2005), and more recently, the disease has been reported in countries where psorosis has never been detected before such as Cuba, Egypt, Turkey and Japan (Velazquez et al. 2005; Ghazal et al. 2008; Kayim 2010; Ito et al. 2011).

Psorosis has been endemic for years in the NE of Argentina, reducing fruit production and causing economic losses (Diamante de Zubrzycki et al. 1984). Despite a successful certification program implemented in the NE region, psorosis still occurs, and more recently, CPsV has been detected in the NW of Argentina (Zanek et al. 2006).

In the field, psorosis symptoms can be observed in 10 to 15-year-old trees, which could have been infected at an early age but not detected. Characteristic psorosis symptoms are bark scaling and gum accumulation in the trunk, flecking, spots and shock in young shoots. The progress of the infection and the onset of these symptoms are very slow, but after several years, gummosis on the trunk causes obstruction of the vascular bundles, general

64 decay, and triggers the death. This fact emphasizes the need for a rapid method of  
65 diagnosis, before the disease has progressed.

66 Once psorosis had been graft-transmitted, a biological index, using young sweet orange  
67 seedlings as indicators plants, was developed (Roistacher 1991). Essentially, this index  
68 involved grafting of sweet orange seedlings with a bark segment of the plant and an  
69 observation period of 1 to 6 months to evaluate the symptoms (Roistacher 1991). Two  
70 kinds of psorosis have been described by graft-transmission: A and B. Psorosis A shows  
71 leaf symptoms as flecking and spots, and shock reaction in very young shoots, in some  
72 isolates. Psorosis B, more aggressive than psorosis A, is characterized by bark-scaling even  
73 on twigs, and gummosis and pustules on the underside of leaves (Roistacher 1993).  
74 Biological indexing is very efficient and sensitive, and therefore, it has been used for  
75 decades in certification programs. However, it is costly, takes a long time, and requires  
76 specialized staff. For those reasons alternative methods of detection and diagnosis have  
77 arisen, which were developed after the causal agent was characterized (García et al. 1991;  
78 García et al. 1997).

79 Citrus psorosis is caused by *Citrus psorosis virus* (CPsV), the type member of the genus  
80 *Ophiovirus*, *Ophioviridae* family. CPsV is multipartite, virions are circular, filamentous  
81 nucleocapsids (García et al. 1994; Milne et al. 2000) and its genome has three single-  
82 stranded RNAs of negative polarity, encapsidated by a coat protein (CP) (Sánchez de la  
83 Torre et al. 1998). RNA 1 encodes the replicase and the 24K protein (Naum-Onganía et al.  
84 2003). RNA 2 encodes the movement protein (Robles Luna et al. 2013), and RNA 3  
85 encodes the CP (Sánchez de la Torre et al. 1998). The sequence of several isolates has  
86 been obtained and used for molecular studies and detection of CPsV (Legarreta et al. 2000;  
87 Martín et al. 2006).



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

88 The CP is the most abundant viral protein in infected tissue (García et al. 1991), and based  
89 on this fact, serological methods were developed for diagnosis. DAS-ELISA (García et al.  
90 1997) and TAS-ELISA (Alioto et al. 1999) were applied with polyclonal and monoclonal  
91 antibodies obtained against the CP of CPsV, detecting the virus in field samples. Using the  
92 same antibodies, a modified TAS-ELISA protocol (TAS-ELISA-HRP) was optimized and  
93 samples from different geographic locations of Argentina, and transgenic citrus  
94 transformed with the coat protein gene were analyzed, resulting in improved sensitivity and  
95 faster analysis (Zanek et al. 2006; Zanek et al. 2008). RT-PCR has been an alternative  
96 method to detect CPsV. Specific primers designed from the RNA1 (García et al. 1997) and  
97 from the CP (Barthe et al. 1998) were applied and later, heminested RT-PCR assay targeted  
98 to a conserved region of RNA1 was used to detect Argentine isolates (Legarreta et al.  
99 2000). All these methods are less expensive, faster and more reliable than biological  
100 indexing. In this sense, Martín et al. (2002) reported a comparison among biological  
101 indexing, hybridization probes, RT-PCR and serological techniques, concluding that  
102 ELISA was the more sensitive and universal method.

103 We have generated transgenic sweet orange plants expressing the cp gene of CPsV (Zanek  
104 et al. 2008). In these plants, the CP is expressed at very low levels, which has been difficult  
105 to detect by TAS-ELISA (Zanek et al. 2008). Currently, the CP in these transgenic plants is  
106 not detectable, probably due to the lower polyclonal antibody titer obtained by Alioto et al.  
107 (1999) or to lower cp expression in adult than in young citrus, as they were assayed in  
108 2008. Citrus transgenic lines expressing hairpin-transcript-derived CPsV cp gene, which  
109 could not be analyzed by TAS-ELISA, were also generated in our laboratory requiring an  
110 alternative detection method.

RT-qPCR is a powerful diagnostic method widely applied to many pathogens and crops, including woody plants such as citrus and citrus relatives. Recently many studies have shown the reliability of this tool even for the simultaneous detection of several viruses in citrus (Loconsole et al. 2010; Lin et al. 2013; Saponari et al. 2013). However, in the case of psorosis, this technique has not been compared to TAS-ELISA, which is the most universal method used to date.

In the current study, a new RT-qPCR protocol was developed using SYBR Green and specific primers designed from the cp gene sequence conserved in all available isolates deposited in databases. Moreover, we compare TAS-ELISA and RT-qPCR applied to field samples from Argentina, isolates maintained in the greenhouse, seedlings from a psorosis natural transmission plot and transgenic plants. We have improved CPsV detection and performed virus quantification, contributing to disease control, evaluation of transgenic plants, and as a diagnostic test in citrus certification programs.

## Materials and Methods

### Samples

Samples of CPsV isolates were taken from the collection of citrus pathogens from the National Institute of Agriculture Technology (INTA), Experiment Station of Concordia (EEA-Concordia), Entre Ríos, Argentina, maintained under greenhouse conditions. All available information about the CPsV isolates is detailed in Table 1 and previous publications (Roistacher et al. 2000; Martin et al. 2006).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Samples from 44 trees from a psorosis natural transmission plot (L504) located in EEA-Concordia were collected during the spring of 2012 and 2013. This plot, planted 35 years ago, contained 504 healthy Pineapple and common sweet oranges, and a row of citrus affected by psorosis was adjacent, as an inoculum, to evaluate natural spread and aerial transmission of psorosis (Beñatena and Portillo 1984; Portillo and Beñatena 1989). Samples from ten additional CPsV-free seedlings recently located near infected adult trees were analyzed. Transgenic citrus plants maintained in EEA-Concordia were included in this work. Leaf samples from transgenic Pineapple sweet orange CP-line 18 (Zanek et al. 2008), which express the complete *cp* gene of CPV4 and, ihpCP-10 and ihpCP-15 lines expressing a hairpin construct with a fragment of the *cp* gene of CPsV 90-1-1 isolate (Reyes et al. 2011) were tested. Leaf samples from CPsV 90-1-1 infected Pineapple sweet orange and non-transgenic non-inoculated plants were used as positive and negative controls, respectively. For each sample, four to five representative leaves of each plant were collected.

Samples of lettuce (*Lactuca sativa*) infected with *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MiLBVV), the other member of the *Ophioviridae* family, citrus samples infected with other viruses such as *Citrus tristeza virus* (CTV) or the unidentified virus that causes concave gum, and citrus infected with bacterium, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xylella fastidiosa*, were included to determine specificity of the assay (Table 2).

Sequence analysis and primer design

To design specific primers for the *cp* gene of CPsV, a multiple alignment of all available RNA3-CPsV sequences was performed with the algorithm ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)) (Fig. 1). Sequences included were: CPsV 90-1-1

(Accession number FJ495195) from Argentina, CPV4 (AF060855) from USA, NA63 (AY194898) from Italy, and P-121 (AY654894.1) from Spain. From several primers designed in the 5' conserved region of the cp gene, according to the optimization of the RT-qPCR parameters, primers selected for retro-transcription and amplification were CP1c (forward): 5' GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGG 3', and CP3 (reverse): 5' GAGACCCTTGTGTAAAAACCAGCAC 3' amplifying a fragment of 113 nucleotides (nt). As a reference gene, the ubiquitin transcript GU362416.1 from *Citrus sinensis* was selected, and new primers were designed: ubqtL (forward): 5' TCTTCACCTCGTGCTTCGTCTCCGT 3', and ubqtR (reverse): 5' GTCCTGGATCTTGGCCTTGACGTTG 3' amplifying a fragment of 127 nt.

#### RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was prepared from 200 mg of fresh leaf tissue ground in liquid nitrogen, mixed with 1 ml of TRI Reagent (Molecular Research Center) and processed according to the manufacturer instructions. RNA extracts were resuspended in 25 µl of RNase-free water and quantified by absorbance at 260 nm. Two micrograms (µg) of total RNA comprised of a volume about 0.5 to 5 µl of RNA preparation were digested with RQ1 RNase-Free DNase (PROMEGA) for 1 h at 37°C in a final volume of 10 µl, following the manufacturer's specifications. After DNase treatment, 5 µl of the preparations (1 µg of total RNA) were subjected to retro-transcription (RT) reaction with MMLV Reverse Transcriptase (PROMEGA) in a final volume of 25 µl, using specific or reference primers, dNTPs, buffer and enzyme at the concentrations specified by the manufacturer. Then, 0.3 µl (12 Units) of RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific) per reaction was added and incubated 1 h at 42°C. Aliquots of 1 µl of cDNA were used as RT-qPCR template. To confirm the



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

182 efficiency of DNase treatment, qPCR was performed without previous cDNA synthesis,  
183 and considers as a negative control of RT-qPCR assays.  
184  
185 RT-qPCR assay development  
186 SYBR Green RT-qPCR was performed in the Fluorescent Quantitative Detection System  
187 FQD- 48A (BIOER). The reactions were performed in a total volume of 20 µl using 5x  
188 HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix (SOLIS Biodyne). The amplification conditions  
189 were as follows: one cycle of 5 min at 95°C followed by 44 amplification cycles of 95°C for  
190 20 s, 56°C for 30 s and 72°C for 20 s, and one final elongation step of 72°C for 5 min. The  
191 melting curve was performed from 72 to 90°C. The optimal concentration for both cp and  
192 ubqt primers was 250 nM. Except for the calibration and serial dilution curves (samples  
193 assayed by triplicate), all samples were conducted in duplicate and the fluorescence values  
194 averaged. Data were analyzed with the software built into the device, Line-gene k FQD-  
195 48A (BIOER). Final products were checked by electrophoresis on 2.0% agarose gel stained  
196 with ethidium bromide. The amplified DNA fragments (CP1c/CP3 amplicon) obtained  
197 from different Argentine isolates were confirmed by sequencing.  
198 To normalize the quantification of the cp-CPsV gene product (cp product), *Citrus sinensis*  
199 ubiquitin transcript was selected as a reference gene, and the fragment (ubqt product)  
200 quantified. Amplification conditions for both the cp and ubqt products were the same. For  
201 calibration curves, the CP1c/CP3 and ubqtL/ubqtR DNA fragments were purified and  
202 quantified by OD<sup>260nm</sup>. Copy numbers of the gene products were calculated referred as: 10<sup>3</sup>,  
203 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> copies.  
204  
205 TAS-ELISA-HRP assay

206 Triple sandwich immunoassay-horseradish peroxidase (TAS-ELISA-HRP, hereinafter  
207 TAS-ELISA) was carried out essentially as described by Zaneck et al. (2006), with  
208 modifications in the antibody dilutions and number of washes. Total protein was extracted  
209 from 200 mg of leaf tissue ground in liquid nitrogen with 1 ml of PBS buffer containing  
210 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T), 2.5% w/v non fat milk powder and 2% (w/v)  
211 polyvinylpyrrolidone (PVP- 40000) (extraction buffer). Wells were first coated with 100  $\mu$ l  
212 of A376 polyclonal antiserum 1/7500 dilution and the plates incubated for 4 h at 37°C.  
213 After three washes with PBS-T, 100- $\mu$ l aliquots of total protein preparations were incubated  
214 with gentle stirring overnight at 4 ° C. After washes, the plates were incubated for 90 min at  
215 37°C with 100  $\mu$ l of monoclonal antibody MAbs 13C5 (IgG) 1/10000 dilution and later,  
216 washed five times. The procedure was repeated with the conjugated antibody, goat anti-  
217 mouse-HRP IgG (H+L)– Peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc) at a  
218 dilution of 1/2000. The peroxidase substrate o-phenylenediamine (OPD) was incubated at  
219 room temperature for 15 to 45 min. The reaction was stopped with 50  $\mu$ l 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
220 Optical density was measured at 492 nm. Samples were analyzed by triplicate. Samples of  
221 infected plants, healthy, non-transgenic plants, and extraction buffer were taken as positive  
222 and negative controls, respectively. The data analysis was performed by calculating the  
223 ratio between the average OD<sup>492nm</sup> of the sample and the average OD<sup>492nm</sup> of the healthy  
224 control (I/H).

## 227 Results

229 Primer design, RT-qPCR development and test specificity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The RT-qPCR protocol has been designed to detect the RNA3 of CPsV coding the CP. Considering that the 5' region of the cp gene is more conserved than the 3' region (Alioto et al. 2003), a multiple alignment of the 5' region sequences among all available sequences in the GenBank, including representative CPsV isolates from Argentina, Italy, Spain and USA (Martín et al. 2006) was performed. Fig. 1 shows a conserved fragment of 113 nt located between positions 738 and 850 of the viral complementary RNA 3 of CPsV. CP1c and CP3 primers were designed on the most conserved region, which is 100% homologous to the CPsV 90-1-1 sequence. Percentages of identity between CPsV 90-1-1 and tested isolates, with available sequences, in the amplified region were: 90% with NA63, 89% with P-121, and 87% with CPV4, the latter being the most distant isolate according to previous studies (Martin et al. 2006).

To optimize qPCR conditions, the hybridization temperature was evaluated using a 52-58°C gradient temperature, resulting 56°C the optimal condition for primers CP1c/CP3.

To test the specificity of the measured SYBR Green fluorescence, the melting curves of the amplified fragments were analyzed. Fig. 2a shows a characteristic melting peak at 79.5°C $\pm$  0.5°C for cp product, CPsV positive samples such as S1 and S2, but not in healthy citrus samples as S3. Nonspecific melting peaks were not observed. Ubiquitin was selected as internal control, since is highly conserved in all citrus species and shows stable expression under different growth conditions (Boava et al. 2011). A melting peak at 84 °C $\pm$  0.5°C for the ubqt product is presented in all samples (Fig. 2a).

Electrophoretic analysis of the qPCR products for both pairs of primers shows single bands corresponding to the expected sizes and did not reveal nonspecific bands nor marked presence of primer dimers (Fig. 2b).

qPCR products (CP1c/CP3 amplicon) amplified from CPsV isolates 90-1-1, 173-22 and 504-3 (Table 1) were confirmed by cloning and sequencing. BLASTn was used to compare the sequences of this amplicon against the GenBank database, and only similarity with the CPsV sequences was found.

To challenge the specificity of the RT-qPCR, in addition to the healthy citrus, leaf samples infected with other pathogens were included. Firstly, we tested lettuce infected with MiLBVV, another member of the *Ophioviridae* family, and the result was negative for CP1c/CP3 amplicon by RT-qPCR (Table 2). Citrus samples infected with pathogens present in the citrus regions of Argentina, previously tested at the Experimental Station INTA Concordia, were also assayed for CPsV. As shown in Table 2, one sample with CVC and one with CG gave negative results for CPsV. Two samples that tested positive for CTV were subjected to CPsV RT-qPCR, one was positive (CTV 126-13) and one negative (CTV 268-1). In the case of citrus canker samples, two them were positive (Valencia orange 1 and 2) and two negative (Valencia orange 3 and Ray Ruby grapefruit).

These assays showed that the RT-qPCR developed with primers CP1c/CP3 is specific for CPsV detection, even in field samples with mixed infections.

269

Sensitivity analysis of RT-qPCR and comparison with TAS-ELISA

The minimum number of cp copies detected in positive samples was  $10^3$  with a maximum Ct value of 30, since  $10^2$  copies did not show amplification bands in electrophoresis, nor the characteristic melting peak, and therefore were considered negative. In addition, Ct values above 30 overlapped with the negative controls. In the case of ubqt,  $10^5$  to  $10^8$  copies were included in the calibration curve, since samples typically contain about  $10^7$  copies. With the aim to determine whether the expression of ubqt gene is altered by the infection of



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

CPsV, we analyzed ubq Ct values in 50 samples, 25 positives for CPsV, and 25 negatives. Their ubqt Ct values were listed and compared statistically and the Ct averages with standard deviations were  $14.1 \pm 0.7$  and  $13.8 \pm 0.9$  for CPsV positive samples and CPsV negative samples, respectively. Furthermore, Student's *t* test was applied to compare both groups of Ct values, yielding a P value of 0.5149 ( $P > 0.05$ ), indicating no significant difference between them. This fact provides experimental evidence for the stability of this internal control in this context. Thus, if quantification is desired, RT-qPCR values can be calculated and referred as the number of cp copies with respect to ubqt copies as shown in Tables 3 and 5.

To test the sensitivity in the quantitative detection of CPsV, a correlation between the Ct value and the number of cp copies was performed. Calibration curves for cp and the ubqt products were done by serial dilutions of purified and quantified CP1c/CP3 and ubqtL/ubqtR DNA fragments. For CP1c/CP3 amplicon, dilutions were adjusted to comprise the Ct values usually obtained in infected plants. Linear regression coefficients ( $R^2$ ) were 0.9913 for cp and 0.9904 for ubqt (Fig. 3a and 3b, respectively) indicating a high degree of accuracy for the assays.

For comparing the sensitivity of RT-qPCR and TAS-ELISA, the same sample preparations and dilutions were analyzed in parallel by both methods (Fig. 4). Positive and negative samples were taken from CPsV 90-1-1 infected and healthy rough lemon, respectively. To prepare comparable samples, leaf tissue was ground and two identical aliquots of 200 mg each were taken either for RNA or protein extraction. After RNA or protein extraction, serial dilutions of positive samples were prepared using the same extract from healthy plants as the diluent, instead of water or buffer. All samples were tested in triplicate.

For TAS-ELISA, a sample is considered positive for CPsV when the ratio between the OD of the sample and the healthy control ( $OD^I/OD^H$ ) is 3:1 or greater (Alioto et al. 1999; Zanek et al. 2006). Only samples diluted 1/10 ( $10^{-1}$ ) or undiluted (1) were considered positive by TAS-ELISA (Fig. 4a). In contrast, RT-qPCR was positive up to the  $10^{-4}$  dilution (Fig. 4b). From these results it can be concluded that detecting CPsV by RT-qPCR provides a test three orders of magnitude more sensitive than the TAS-ELISA.

RT-qPCR is able to detect all tested CPsV isolates

A test was performed with 14 samples of citrus plants kept in the greenhouse, which included five healthy plants and nine plants infected with different isolates of CPsV including psorosis A and B, covering different symptoms and geographical distributions of psorosis. Samples were analyzed by TAS-ELISA and RT-qPCR (Table 3). Both methods agree on the results for all isolates assayed, including the CPV4, the most distant isolate studied so far. Since the TAS-ELISA values correspond to coat protein concentration, there is not necessarily a correlation with the RT-qPCR values detecting RNA, and thus, values by the two methods are not comparable.

RT-qPCR is more sensitive than TAS-ELISA in naturally infected citrus

For field sampling we chose the L504 plot (Beñatena and Portillo 1984), which had a high incidence of psorosis. In this plot, samples were selected according to a random spatial distribution and analyzed by TAS-ELISA and RT-qPCR. Table 4 shows the results for 44 plants. Thirty-six diagnoses were coincident by both methods, 20 samples were CPsV-positive and 16 were negative. Within the group of 20 positive samples, six were symptomatic, whereas in the group of the 16 negative samples none of them were

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

324 symptomatic. The eight remaining samples resulted positive by RT-qPCR but negative by  
325 TAS-ELISA, two of them were symptomatic supporting the RT-qPCR. Moreover, there  
326 were no positive samples by TAS-ELISA and negative by RT-qPCR, and none of them  
327 showed any symptoms of psorosis.

328 In the same plot, trays of 100 healthy young sweet oranges were located near the infected  
329 trees. Months later, they were analyzed by TAS-ELISA as pools of ten individuals. Nine of  
330 those pools were undoubtedly negative. One pool yielded a TAS-ELISA value close to the  
331 cutoff but below it, suggesting there may be positive samples, but it was clearly CPsV-  
332 positive by RT-qPCR. Then, the 10 plants of this pool were analyzed individually by RT-  
333 qPCR with five being positive and five negative for CPsV. This assay provided preliminary  
334 evidence for the natural spread of psorosis, strongly indicating that the RT-qPCR could  
335 detect very low concentration of virus at the early stages of natural infection.

336

337 RT-qPCR is useful for measuring transgene expression in cp transgenic plants

338 Previously in our laboratory TAS-ELISA was used to analyze the level of the CP  
339 expression in transgenic lines (Zanek et al. 2008). Although with very low value, several of  
340 them were positive, including the CP-18 line, demonstrating CP expression. After seven  
341 years, these plants matured and CP protein expression could not be detected by this method,  
342 yielding values below the cutoff (data not shown). Later, Reyes et al. (2011) generated  
343 transgenic lines ihpCP-10 and 15, expressing a hairpin transcript of the cp gene, which was  
344 not detected by Northern blot. This was not surprising, since it is expected that the amount  
345 of this transcript would be very low due to the triggering of the post-transcriptional gene  
346 silencing mechanism induced by its hairpin structure (Reyes et al. 2011). In this work, by  
347 RT-qPCR using the same primers, CP1c/CP3, the RNA synthesized from the transgenes in

lines CP-18, ihpCP-10 and 15 was detected in three individual samples in duplicate (Table 5). Measuring the expression level as cp copies/100 ubqt copies, these lines showed different expression level, whereas non-transgenic citrus were negative. To discard detection of the DNA transgenes, RNA without cDNA synthesis was assayed by RT-qPCR after DNase treatment and showed no amplification (data not shown).

## Discussion

RT-qPCR is currently the most widely used method to quantify changes in gene expression and diagnosis (Bustin et al. 2009). CPsV has been previously detected by RT-qPCR using Taqman probes applied successfully for detection of Mexican and European CPsV samples (Barragán-Valencia et al. 2008; Loconsole et al. 2010), but not comparison has been done with TAS-ELISA or biological indexing. Here, we report for the first time the use of a RT-qPCR as a diagnostic tool in Argentina, applying a new and less expensive protocol using SYBR Green. Extensive detection was demonstrated with isolates from different geographic regions, showing a variety of symptoms, in different types of psorosis (A and B), asymptomatic tissue, field samples from old trees, and in early naturally infected young seedlings. Despite the low levels of expression of the transgenes that transgenic citrus could have, the cp product was also successfully detected in such plants.

In comparison to current methods used to quantify virus, most of them serological methods, the main advantage of RT-qPCR is its higher sensitivity, even when limited amounts of RNA is available. In this respect, we compared the new RT-qPCR protocol with TAS-ELISA (Zanek et al. 2006), used as the most sensitive method for quantitative CPsV



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

detection in many countries. This RT-qPCR protocol is faster and reliable, and can be performed with commercially available reagents, whereas TAS-ELISA depends on the availability of the serum, which becomes depleted. Furthermore, even if a new antiserum were available, it could not necessarily detect the virus at the same level as the current TAS-ELISA protocol.

RT-qPCR allowed us to show that CPsV-infected samples can have a wide range of viral titers, from 1 to 100 copies of cp/ 100 ubqt copies. We also quantified the cp-RNA and ihpCP-RNA in transgenic citrus plants by RT-qPCR that had not been detected before, indicating that the new RT-qPCR assay will serve for biological studies and to quantify viral RNA 3 species, which are expressed at very low levels (Sanchez de la Torre et al. 1998).

The detection limit of our RT-qPCR protocol is clearly established ( $C_t \leq 30$  or 1000 cp copies). In contrast, by TAS-ELISA a cut-off for positive samples needed clarification, since TAS-ELISA values frequently have ambiguous results, with I/H near the cut-off, as shown by Alioto et al. (1999) testing 119 samples. Neither this publication nor Zanek et al. (2006) detailed treatment of those samples giving I/H values between 2 and 3 and for this reason a value of 2 is sometimes considered the cut-off point (M.I. Plata and M. Cambra, personal communications). In this work, although TAS-ELISA and RT-qPCR gave a matching diagnosis in all greenhouse samples and in most field samples tested (36/44), we found that RT-qPCR can detect the CPsV in samples that were negative by TAS-ELISA. We could not confirm whether these results are false positives by RT-qPCR or false negative by TAS-ELISA, but the appearance of typical symptoms of psorosis in some of these cases supports the RT-qPCR results. While observation of symptoms strongly indicates the disease, we found asymptomatic samples that both TAS-ELISA and RT-qPCR

revealed the presence of CPsV. Therefore, it could be that biological indexing, as a third method, supports one or the other method, but also could not be sensitive enough.

Our goal in the future is the validation of the RT-qPCR in order to have a fast, reliable and accurate diagnosis method for psorosis, including at early stages of the natural infection as shown in this work.

### Acknowledgements

We thank Fabián Ramos and Patricia Fernández (EEA-Concordia) for their observations in the field and plant maintenance in the greenhouse. We thank Carina A. Reyes, Eduardo J. Peña and Gabriel Robles Luna for helpful comments on the manuscript. This work has been supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) PICT 2008-1094, PIP 445 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) X562, and Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (PNFRU-1172; 11721; ERIOS-630081).

### References

Alioto D, Gangemi M, Deaglio S, Sposato S, Noris E, Luisoni E, Milne RG. (1999) Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathol* 48: 735–741.

1  
2  
3 419 Alioto D, Malfitano M, Troisi A, Peluso A, Martín S, Milne G, Guerri J, Moreno P. (2003)  
4  
5 420 Variability of the coat protein gene of Citrus psorosis virus in Campania, southern  
6  
7 421 Italy. Arch Virol 148: 2155–2166.  
8  
9  
10 422 Barthe GA, Ceccardi TL, Manjunath KL, Derrick KS. (1998) Citrus psorosis virus:  
11  
12 423 nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and  
13  
14 424 RT-PCR. J Gen Virol 79: 1531–1537.  
15  
16  
17 425 Barragán-Valencia G, Morales-Loredo A, Álvarez-Ojeda MG, Peña-del-Río MA, Quintero-  
18  
19 426 Zapata I. (2008) Detección Cuantitativa del Virus Psorosis de Cítricos mediante RT-  
20  
21 427 PCR Tiempo Real. Agrociencia 42: 225–232.  
22  
23  
24 428 Beñatena HN, Portillo MM. (1984) Natural spread of Psorosis in sweet orange seedlings.  
25  
26 429 In: Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA. (eds) Proc 9th Conference of the  
27  
28 430 International Organization of Citrus Virologists, 9-13 May 1983. Riverside, CA,  
29  
30 431 USA, IOCV, pp 159–164.  
31  
32  
33 432 Boava LP, Cristofani-Yaly M, Mafra VS, Kubo K, Kishi LT, Takita MA, Ribeiro-Alves M,  
34  
35 433 Machado MA. (2011) Global gene expression of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki* and  
36  
37 434 their hybrids under infection of *Phytophthora parasitica*. BMC Genomics 12: 39.  
38  
39  
40 435 Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T,  
41  
42 436 Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesomplele J, Wittwer CT. (2009) The MIQE  
43  
44 437 guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR  
45  
46 438 experiments. Clin Chem 55: 4 (Reviews).  
47  
48  
49 439 Diamante de Zubrzycki A, Zubrzycki HM, Correa M. (1984) Determination of the  
50  
51 440 Distribution of Psorosis in Commercial Plantings. In: Garnsey SM, Timmer LW,  
52  
53 441 Dodds JA. (eds) Proc 9th Conference of the International Organization of Citrus  
54  
55 442 Virologists, 9-13 May 1983. Riverside, CA, USA, IOCV, pp 165–170.  
56  
57  
58  
59  
60

- 443 Fawcett HS. (1932) New angles on treatment of bark diseases of citrus. Calif. Citograph 17:  
444 406–408.
- 445 García ML, Grau O, Sarachu AN. (1991) Citrus psorosis is probably caused by a bipartite  
446 ssRNA virus. Res Virol 142: 303–311.
- 447 García ML, Dal Bó E, Grau O, Milne RG. (1994) The closely related citrus ringspot and  
448 citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. J Gen Virol  
449 75: 3585–3590.
- 450 García ML, Sánchez de la Torre ME, Dal Bo E, Djelouah K, Rouag N, Luisoni E, Milne  
451 RG, Grau O. (1997) Detection of citrus psorosis - ringspot virus using RT-PCR and  
452 DAS-ELISA. Plant Pathol 46: 830–836.
- 453 Ghazal SA, El-DougDoug KA, Mousa AA, Fahmy H, Sofy AR. (2008) Isolation and  
454 identification of citrus psorosis virus Egyptian isolate (CPsV-EG). Comm Agr Appl  
455 Biol Sci 73(2): 285–295.
- 456 Gottwald TR, Palle SR, Miao H, Seyran M, Skaria M, da Graca JV. (2005) Assessment of  
457 the possibility of natural spread of Citrus Psorosis disease. In: Hilf ME, Duran-Vila  
458 M, Rocha-Peña MA. (eds) Proc 16th Conference of the International Organization of  
459 Citrus Virologists, 3-6 November 2004. Riverside, CA, USA, IOCV, pp 240–250.
- 460 Iglesias NJ, Gago-Zachert SP, Robledo G, Costa N, Plata MI, Vera O, Grau O, Semorile  
461 LC. (2008) Population structure of Citrus tristeza virus from field argentinean  
462 isolates. Virus genes 36: 199–207.
- 463 Ito T, Furuta T, Namba N. (2011) First report of Citrus psorosis virus in Japan. J Gen Plant  
464 Pathol 77: 257–259.
- 465



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Kayim M. (2010) Biological and molecular detection of Citrus Psorosis Virus in Citrus in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *J Plant Biochem Biot* 19: 259–262.

Legarreta GG, García ML, Costa N, Grau O. (2000) A highly sensitive heminested RT-PCR assay for the detection of citrus psorosis virus targeted to a conserved region of the genome. *J Virol Meth* 84: 15–22.

Lin L, Li R, Bateman M, Mock R, Kinard G. (2013) Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *Eur J Plant Pathol* 137: 797–804.

Loconsole G, Saponari M, Savino V. (2010) Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *Eur J Plant Pathol* 128: 251–259.

Martín S, Alioto D, Milne RG, Guerri J, Moreno P. (2002) Detection of citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathol* 51: 134–141.

Martín S, García ML, Troisi A, Rubio L, Legarreta GG, Grau O, Alioto D, Moreno P, Guerri J. (2006) Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J Gen Virol* 87: 3097–3102.

Milne RG, García ML, Grau O. (2000) Genus Ophiovirus. In: van Regenmortel MVH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK. (eds) *Virus Taxonomy*, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK, Elsevier/Academic, pp 626–631.

- Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O, García ML. (2003) Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res* 96: 49–61.
- Portillo MM, Beñatena HN. (1989) Transmisión de psorosis de citrus a citrus por áfidos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 45(86): 299–305.
- Reyes CA, De Francesco A, Peña EJ, Costa N, Plata MI, Sendin L, Castagnaro AP, García ML. (2011) Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein–RNA silencing. *J Biotechnol* 151(1): 151–158.
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML. (2013) Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441(2): 152–161.
- Roistacher CN. (1991) Psorosis complex: psorosis-A, psorosis-B and ringspot. In: International Organization of Citrus Virologists. (ed) *Graft-Transmissible Diseases of Citrus, Handbook for Detection and Diagnosis*. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp 115–126.
- Roistacher CN. (1993) Psorosis- a review. In: Moreno P, da Graca JV, Timmer LW. (eds) *Proc 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 23-27 November 1992. Riverside, CA, USA, IOCV, pp 139–154.
- Roistacher CN, D’Onghia AM, Djelouah K. (2000) Other viruses: Defining psorosis by biological indexing and ELISA. In: da Graca JV, Lee RF, Yokomi RK. (eds) *Proc 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 13-18 September 1998. Riverside, CA, USA, IOCV, pp 144–151.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

512 Sánchez de la Torre ME, Riva O, Zandomeni R, Grau O, García ML. (1998) The top  
513 component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat  
514 protein. Molecular Plant Pathology Online [<http://www.bspp.org.uk/mppol>]  
515 1998/1019sanchez.

516 Saponari M, Loconsole G, Liao HH, Jiang B, Savino V, Yokomi RK. (2013) Validation of  
517 high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous  
518 detection of invasive citrus pathogens. J Virol Meth 193: 478–486.

519 Velazquez K, Perez JM, Alonso M, Batista L, Rodriguez J, Legarreta G, Grau O, García  
520 ML. (2005) Detection of Citrus psorosis virus in Cuba. In: Hilf ME, Duran-Vila M,  
521 Rocha-Peña MA. (eds) Proc 16th Conference of the International Organization of  
522 Citrus Virologists, 3-6 November 2004. Riverside, CA, USA, IOCV (Short  
523 Communications).

524 Zaneck MC, Peña E, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O, García ML. (2006) Detection  
525 of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by  
526 using an improved TAS - ELISA. J Virol Meth 137: 245–251.

527 Zaneck MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velazquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña  
528 L, García ML (2008) Genetic transformation of sweet orange with the coat protein  
529 gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. Plant Cell  
530 Rep 27: 57–66.

## Tables

**Table 1** Plant samples infected with *Citrus Psorosis Virus* (CPsV) isolates used in this study

CPsV isolate	Isolated from	Maintained in	Origin	Psorosis type	Symptoms
90-1-1	Trifoliate orange ( <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)	Pineapple sweet orange (PSwO) ( <i>Citrus sinensis</i> L. Osb.) and rough lemon ( <i>C. lemon jambhiri</i> Lush.)	Argentina	A	F, S, Sh
112-1	Willowleaf mandarin ( <i>Citrus deliciosa</i> Tenore)	PSwO	Argentina	A	F, S, Sh
CPV4	PSwO	PSwO	USA	A	F, S
P-121	PSwO	PSwO	Spain	A	F, S
173-22	Ellendale mandarin ( <i>Citrus reticulata</i> Blanco)	PSwO	Argentina	-	Sh, F, M, V
189-34	PSwO	PSwO	Argentina	B	G
P-250	PSwO	PSwO	USA	B	BS, B
504-3	PSwO	PSwO	Argentina	A	Sh, F, BS
248-2	Satsuma mandarin ( <i>Citrus unshi</i> Marcovitch)	PSwO	Argentina	A	F, S, Sh

Symptoms found upon characterization of isolates. F: flecking, S: spots on young leaves, and Sh: shock in young shoots, M: mottle, V: variegation, G: gum in mature leaves and twigs, BS: bark scaling on trunk, B: blisters.



**Table 2** Specificity. Detection of CPsV by RT-qPCR in citrus samples infected with other pathogens

Plant host	Origin	Disease/causal agent	Psorosis diagnosis by RT-qPCR
Lettuce	La Plata, Argentina (field)	Big-vein / MiLBVV <sup>a</sup>	-
Pineapple sweet orange	Concordia, Argentina (greenhouse)	Tristeza / CTV (126-13 isolate) <sup>b</sup>	+
Key lime	Concordia, Argentina (greenhouse)	Tristeza/ CTV (268-2 isolate) <sup>c</sup>	-
Salustiana orange	Concordia, Argentina (field)	Citrus variegated chlorosis (CVC)/ <i>Xylella fastidiosa</i> <sup>d</sup>	-
Pineapple sweet orange	USA (greenhouse)	Concave gum (CG-301) <sup>e</sup>	-
Valencia orange	Concordia, Argentina (field)	Citrus canker/ <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (1) <sup>f</sup>	+
Valencia orange	Concordia, Argentina (field)	Citrus canker/ <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (2) <sup>f</sup>	+
Valencia orange	Concordia, Argentina (field)	Citrus canker/ <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> <sup>f</sup>	-
Ray Ruby grapefruit	Concordia, Argentina (field)	Citrus canker/ <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> (3) <sup>f</sup>	-

RT-qPCR (+) when Ct ≤ 30.

<sup>a</sup> Leaf sample with symptoms of Big-vein and MiLBVV positive by RT-PCR .

<sup>b</sup> Leaf sample extracted from a Pineapple sweet orange field tree biologically tested positive for CTV.

<sup>c</sup> Leaf sample extracted from a field tree biologically tested positive for CTV, and by molecular analysis performed by Iglesias et al. (2008).

<sup>d</sup> Leaf sample extracted from a field tree tested positive for CVC by DAS-ELISA (Agdia®).

<sup>e</sup> Leaf sample extracted from a field tree biologically tested positive for concave gum, and maintained in greenhouse by inoculation in indicator citrus. Currently used as positive control for concave gum (Roistacher et al. 2000).

<sup>f</sup> Leaf sample extracted from field trees defined positive for canker by symptomatology. (1), (2) and (3) refers to three different field trees.

**Table 3** Comparison of TAS-ELISA and RT-qPCR results for greenhouse trial with different CPsV isolates

Sample	Symptoms	TAS-ELISA diagnosis	RT-qPCR Ct average +/- SD	RT-qPCR (cp copies/100 ubqt copies)	RT-qPCR diagnosis
CPsV 189-34	Sh, V, F, S, G	+	17.9 +/- 0.2	3.6	+
CPsV P-250	F, S, G, B	+	15.8 +/- 0.6	7.6	+
CPsV 504-3	Sh, F, M, V	+	19.2 +/- 0.8	8.0	+
CPsV 293-24	M	+	19.8 +/- 0.9	5.2	+
CPsV 173-22	Sh, F, M, V	+	21.1 +/- 0.2	2.3	+
healthy 1	none	-	31.3 +/- 0.2	0	-
healthy 2	none	-	34.5 +/- 0.4	0	-
healthy 3	none	-	32.0 +/- 0.1	0	-
healthy 4	none	-	30.5 +/- 0.9	0	-
healthy 5	none	-	29.8 +/- 0.7	0	-
90-1-1 isolate	Sh, F, M, V	+	15.3 +/- 0.4	18.2	+
CPsV 112-1	Sh, F, M, V	+	19.0 +/- 0.5	11.5	+
CPsV 248-2	Sh, F, M, V	+	15.3 +/- 0.6	5.6	+
CPV4 isolate	S	+	18.5 +/- 0.3	1.4	+

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

563 Symptoms at the time of sampling: Sh: shock, V: variegation, F: flecking, S: spots, G: Gum  
564 accumulation, M: mottle, B: blisters.  
565 TAS-ELISA (+) when  $OD^L/OD^H \geq 3$ . RT-qPCR (+) when  $Ct \leq 30$ .  
566 Ct average: threshold cycle average of duplicates; SD: standard deviation.  
567

For Peer Review

**Table 4** Comparison of diagnosis by TAS-ELISA and qRT-PCR in field samples

TAS-ELISA	RT-qPCR	Number of samples/ total samples	Symptomatic samples/ total samples analyzed in the group
+	+	20/44	6/20
-	-	16/44	0/16
-	+	8/44	2/8
+	-	0/44	0

TAS-ELISA is (+) when  $OD^I/OD^H \geq 3$ .

RT-qPCR is (+) when  $Ct \leq 30$ .



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Table 5** Detection of cp product by RT-qPCR in transgenic Pineapple sweet orange

Transgenic citrus line	sample	Ct average +/- SD	cp copies/100 ubqt copies
CP-18	1	20.4 +/- 0.9	20.2
	2	19.62 +/- 0.06	17.5
	3	20.2 +/- 0.5	15.6
ihpCP-10	1	19.19 +/- 0.07	6.14
	2	18.32 +/- 0.01	12.7
	3	24 +/- 1	12.0
ihpCP-15	1	20.2 +/- 0.9	10.9
	2	22 +/- 1	10.0
	3	18.31 +/- 0.02	14.7
Non tg	1	34.1 +/- 0.4	0
	2	31 +/- 1	0
	3	29.8 +/- 0.9	0

For each transgenic line, three independent samples were analyzed (1, 2 and 3).  
Ct average: threshold cycle average of duplicates; SD: standard deviation.

## Legend figures

**Fig. 1** Alignment of GenBank sequences of CPsV isolates from Italy, Spain, Argentina and USA in the region amplified by the CP1c/CP3 primers. Homology in the primer region is indicated by black boxes. White boxes indicate homology in the remaining sequence.

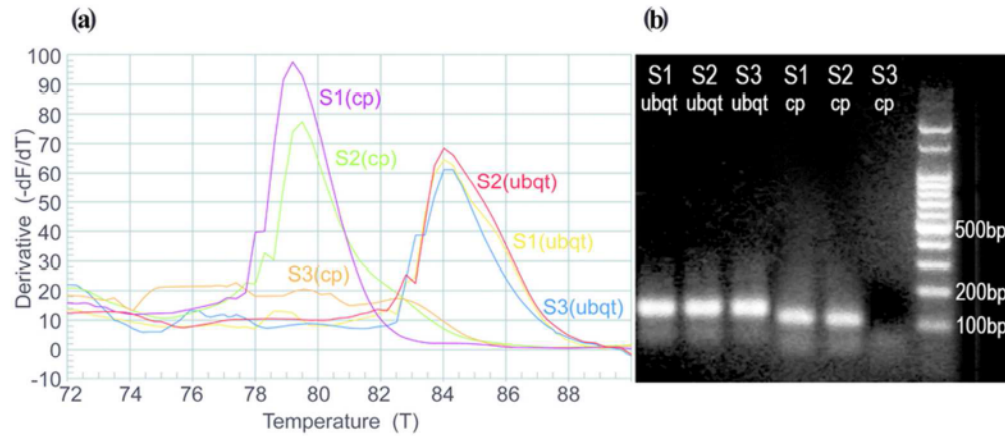
**Fig. 2** Analysis of the RT-qPCR products of CPsV-positive samples (S1, S2) and CPsV-negative sample (S3). (a) Melting curve analysis for cp and ubqt products; (b) Electrophoresis analysis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Bands corresponding to 127 nt and 113 nt for ubqt and cp, respectively are shown. DNA ladder of 100 bp is indicated.

**Fig. 3** Calibration curves for RT-qPCR. Threshold Cycle (Ct) values versus the logarithm of DNA copies of: (a) CP1c/CP3 amplification products (cp), from  $10^3$  to  $10^7$  copies; (b) ubqtL/ubqtR products (ubqt), from  $10^5$  to  $10^8$  copies. Linear regression parameters and coefficients are indicated in each graph.

**Fig. 4** Ten-fold serial dilution of total RNA and proteins extracted from the same CPsV 90-1-1 infected tissues diluted in healthy extract, analyzed by (a) TAS-ELISA and (b) RT-qPCR. (a) I/H ratio calculated as  $OD^{492nm}$  average of the individual triplicates by the same average of healthy control; (b) Threshold Cycle (Ct) average of triplicates. The values shown in parentheses, express the number of cp copies divided by 100 ubqt copies. Dashed lines indicate the cutoff of TAS-ELISA, I/H=3, and Ct=30 for RT-qPCR.



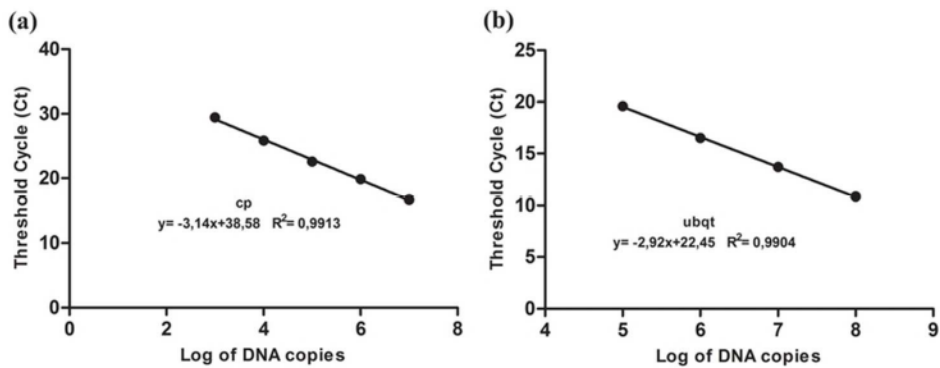
Alignment of GenBank sequences of CPsV isolates from Italy, Spain, Argentina and USA in the region amplified by the CP1c/CP3 primers. Homology in the primer region is indicated by black boxes. White boxes indicate homology in the remaining sequence.  
61x16mm (300 x 300 DPI)



Analysis of the RT-qPCR products of CPsV-positive samples (S1, S2) and CPsV-negative sample (S3). (a) Melting curve analysis for cp and ubqt products; (b) Electrophoresis analysis in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Bands corresponding to 127 nt and 113 nt for ubqt and cp, respectively are shown. DNA ladder of 100 bp is indicated.

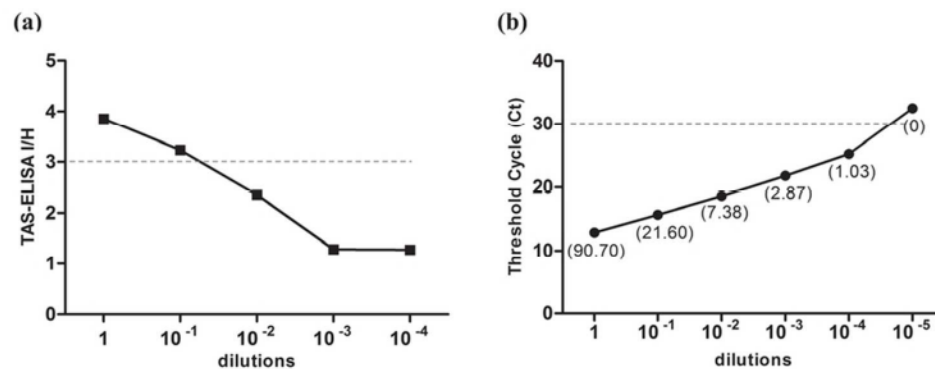
77x34mm (300 x 300 DPI)





Calibration curves for RT-qPCR. Threshold Cycle (Ct) values versus the logarithm of DNA copies of: (a) CP1c/CP3 amplification products (cp), from  $10^3$  to  $10^7$  copies; (b) ubqtL/ubqtR products (ubqt), from  $10^5$  to  $10^8$  copies. Linear regression parameters and coefficients are indicated in each graph.

73x27mm (300 x 300 DPI)



Ten-fold serial dilution of total RNA and proteins extracted from the same CPsV 90-1-1 infected tissues diluted in healthy extract, analyzed by (a) TAS-ELISA and (b) RT-qPCR. (a) I/H ratio calculated as  $OD^{492nm}$  average of the individual triplicates by the same average of healthy control; (b) Threshold Cycle (Ct) average of triplicates. The values shown in parentheses, express the number of cp copies divided by 100 ubqt copies. Dashed lines indicate the cutoff of TAS-ELISA, I/H=3, and Ct=30 for RT-qPCR.

78x31mm (300 x 300 DPI)



## Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein–RNA silencing

Carina Andrea Reyes<sup>a</sup>, Agustina De Francesco<sup>a</sup>, Eduardo José Peña<sup>a,d,1</sup>, Norma Costa<sup>b</sup>, María Inés Plata<sup>b</sup>, Lorena Sendin<sup>c</sup>, Atilio Pedro Castagnaro<sup>c</sup>, María Laura García<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET – UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Estación Experimental Agropecuaria, INTA, Concordia, Entre Ríos, Argentina

<sup>c</sup> Estación Experimental Agroindustrial Agropecuaria Obispo Colombes, Las Talitas, Tucumán, Argentina

<sup>d</sup> Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (UPR 2357), Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 July 2010

Received in revised form 4 November 2010

Accepted 8 November 2010

#### Keywords:

Citrus psorosis virus

Post-transcriptional gene silencing (PTGS)

Hairpin-RNA

Transgenic sweet orange

Ophiovirus

Viral resistance

### ABSTRACT

The lack of naturally occurring resistance to Citrus psorosis virus (CPsV) has demanded exploitation of a transgenic approach for the development of CPsV-resistant sweet orange plants. Transgenic sweet orange plants producing intron-hairpin RNA transcripts (ihpRNA) corresponding to viral *cp*, *54K* or *24K* genes were generated and analyzed at the molecular and phenotypic levels. Two independent CPsV challenge assays demonstrated that expression of ihpRNA derived from the *cp* gene (ihpCP) provided a high level of virus resistance, while those derived from *54K* and *24K* genes (ihp54K and ihp24K) provided partial or no resistance. The presence of small interfering RNA molecules (siRNAs) in the ihpCP transgenic sweet orange plants prior to virus challenge, indicated that CPsV resistance was due to pre-activated RNA silencing, but siRNAs accumulation level was not directly correlated to the degree of the triggered virus resistance among the different lines. However, pre-activation of the RNA-silencing machinery and a certain minimum accumulation level of siRNA molecules targeting the viral genome are key factors for creating virus-resistant plants. This is the first report of resistance in citrus plants against a negative-strand RNA virus as CPsV.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Citrus psorosis, first described by Swingle and Webber (1896), is a severe viral disease affecting most citrus varieties in many countries in the Americas, Africa, and the Mediterranean Basin (Roistacher, 1993). The disease may take several years to manifest symptoms, which include bark scaling of the trunk on sweet orange, mandarin and grapefruit and chlorotic flecks and spots on young leaves. These foliar symptoms are also observed in experimentally graft-inoculated sweet orange seedlings that are commonly used as biological indicators for the indexing of psorosis (Roistacher, 1991). In Argentina, a certification program has met with limited success in controlling citrus psorosis. Because the etiologic agent is probably spread by an unknown vector (Beñatena and Portillo, 1984),

the disease is still causing significant economical losses (Anderson, 2000).

The causal agent of the disease is Citrus psorosis virus (CPsV), the type member of the genus *Ophiovirus* (García et al., 1994; Milne et al., 2003). The virus is tripartite and its genome consists of three ssRNAs of negative polarity. RNA 1 carries two open-reading frames (ORFs): a 24-kDa polypeptide of unknown function (the 24K protein) and, separated by an intergenic region, the putative RNA-dependent RNA polymerase of 280 kDa (Naum-Onganía et al., 2003). RNA 2 carries one gene coding for a polypeptide of 53.6 kDa of unknown function (the 54K protein), while RNA 3 codes for the coat protein (CP) of 48.6 kDa (Sánchez de la Torre et al., 1998, 2002).

RNA silencing in plants, is part of a natural defence mechanism against viruses and mobile genetic elements triggered by the presence of specific double-stranded RNA (dsRNA) molecules, which in turn initiate a cascade of downstream molecular events (Gura, 2000; Baulcombe, 2004; Susi et al., 2004; Almeida and Allshire, 2005; Takeda et al., 2005). The dsRNA molecules are cleaved by a dsRNA-specific endonuclease, resulting in 21–28 nt fragments. These small interfering RNAs (siRNAs) associated with a RNA-induced silencing complex (RISC), become in single stranded and bind to target RNA molecules of perfect or near perfect complementary leading its degradation. The subsequent alterations in

\* Corresponding author at: Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina. Tel.: +54 221 4259223; fax: +54 221 4259223.

E-mail address: [garcia\\_m@biol.unlp.edu.ar](mailto:garcia_m@biol.unlp.edu.ar) (M.L. García).

<sup>1</sup> Present address: Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (UPR 2357), Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France.

RNA expression affect a remarkably broad range of biological processes including developmental timing and patterning, genome rearrangement, heterochromatin formation and antiviral defence. In the case of virus resistance, a systemic-silencing signal provides plants with an early warning system that assists in the control of viral infection (Voinnet et al., 1998; Dunoyer et al., 2010; Fire, 1999; Vaucheret et al., 2001).

The use of dsRNA to trigger RNA silencing can be achieved by transformation with sense and antisense sequences separated by an intron (intron-hairpin design) (Fire et al., 1998). On transcription, the resulting hairpin RNA acts as a strong inducer of post-transcriptional gene silencing (PTGS) (Smith et al., 2000). This strategy has been used to produce virus-resistant transgenic plants (Helliwell and Waterhouse, 2003; Hily et al., 2007; Kreuze et al., 2008; Prins et al., 2008; Shimizu et al., 2009; Fahim et al., 2010), with the accumulation of transgene-derived siRNAs being regarded as a predictor of resistance to virus infection (Kalantidis et al., 2002).

Research on herbaceous systems and positive RNA viruses showed successful viral gene-mediated protection by PTGS. In addition, a few examples from resistant transgenic woody plants based on this approach, such as *Prunus* for Plum pox virus resistance (Scorza et al., 2001), and citrus for Citrus tristeza virus resistance (Fagoaga et al., 2006; Febres et al., 2008) has been reported.

In a previous work we reported the development of transgenic sweet orange expressing the coat protein of CPsV with different transgene copy numbers, but no resistance was found in the tested CP-lines (Zanek et al., 2008). Here we describe the generation of transgenic sweet orange lines expressing hairpin-RNA transcripts corresponding to the CPsV *cp* (ihpCP), *54K* (ihp54K) and *24K* (ihp24K) genes. We demonstrated that the expression of ihpRNA derived from the *cp* gene (ihpCP) provided a high level of virus resistance.

## 2. Materials and methods

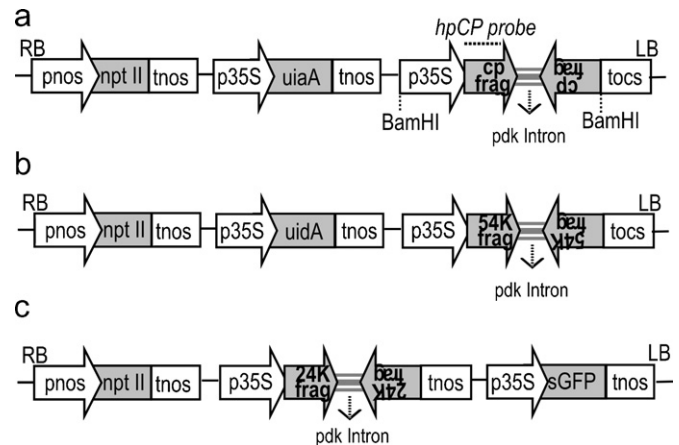
### 2.1. Viral isolates, genetic constructs, and bacterial strains

Isolate CPsV 90-1-1 (INTA-Concordia collection, Entre Ríos, Argentina) was used for the infection assays. Pineapple sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) was infected by graft inoculation with virus-bearing citrus tissue.

Genetic constructs used in this study are shown in Fig. 1. Lengths of hairpin-CP (ihpCP) hairpin-54K (ihp54K) and hairpin-24K (ihp24K) fragments are 372, 436, and 312 bp respectively. ihpCP and ihp54K constructs were generated previously (Reyes et al., 2009).

For ihp24K construct, fragments were amplified by RT-PCR from total RNA extracted from CPsV-90-1-1 – infected citrus leaves. Primers were designed (Table 1) considering identity among sequences from the available CPsV isolates (Martín et al., 2006). Restriction sites were added to the ends so that fragment insertions could be made in both sense and antisense orientations in the pHANNIBAL vector (Wesley et al., 2001, provided by CSIRO, Plant Industry). Primer ihp24K1 contained BamHI and EcoRI sites, and primer ihp24K2 contained HindIII and KpnI sites (Table 1). PCR products were cloned into the pGEMT-easy vector (Promega) from where they were excised and cloned into pHANNIBAL vector in two steps. This directional ligation built both hairpin arms separated by the *pdk* intron. The cassette was then subcloned into the binary vector pBin19sgfp (Chiu et al., 1996), in order to transform sweet orange plants.

p35S-ihpCP, p35S-ihp54K and pBin19-ihp24K (Fig. 1) used for plant transformation were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 by electroporation. The DNA sequences of the clones were verified before bacterial transformation.



**Fig. 1.** Intron-hairpin RNA expression cassettes derived from the CPsV 90-1-1 isolate in the binary vectors used for sweet orange transformation (p35S-ihpCP, p35S-ihp54K or pBin19-ihp24K). Key to figure abbreviations: *cp-frag*, *54K-frag* or *24K-frag* (372 bp, 436 bp or 312 bp respectively); *nptII*: neomycin-phosphotransferase gene; *uidA*: β-glucuronidase gene; *sgfp*: synthetic green fluorescent protein; *pdk* intron: intron from pyruvate-orthophosphate dikinase; *pnos*: nopaline-synthase promoter; *p35S*: Cauliflower mosaic virus promoter; *tnos*: nopaline-synthase terminator; *tocs*: octopine-synthase terminator; *BamHI*: restriction recognition site; *RB*: right border; *LB*: left border. The hpCP probe used for southern and northern blot analysis is also indicated.

### 2.2. Plant transformation and regeneration

Pineapple sweet orange seedlings were transformed as previously described (Peña et al., 1995; Zanek et al., 2008). Briefly, internodal stem segments from 6- to 12-month-old greenhouse-grown plants were cocultivated with *A. tumefaciens* EHA 105 carrying the binary vectors p35S-ihpCP, p35S-ihp54K or pBin19-ihp24K. A basal section of selected shoots regenerated from the stem segments was assayed for *uidA* gene expression (GUS) for ihpCP and ihp54K lines, or by observation of GFP fluorescence for the ihp24K lines. Positive shoot tips were grafted in vitro on decapitated and etiolated seedlings of Troyer citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *C. sinensis* (L.) Osbeck). After 3–4 weeks, scions were screened for the presence of the transgenes by PCR using primers ihpCP1a/*pdk2*, ihp54K2a/*tocs* and ihp24K1/*pdk2* (Table 1). Positive transgenic plantlets were then side-grafted on vigorous 6-month-old seedlings of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) and grown in a greenhouse maintained at 18–24°C, with a 18 h day length provided by a mix of natural and supplemental light.

### 2.3. Propagation, graft-inoculation, and symptom observation

For challenge assays, 10–12 buds from each transgenic line were propagated by grafting onto 6–8-month-old rough lemon seedlings. After 10 months replicates were graft-inoculated on the scion with one piece of infected tissue carrying the CPsV 90-1-1 isolate, homologous to the hairpin transgene. The inoculum remained in the plants throughout the challenge period. The plants were harvested and pruned in order to force the new flush for symptom observation and molecular analyzes. The plants were maintained in a greenhouse at 18–24°C and with controlled light. They were observed for development of symptoms on successive flushes. After each observation, leaf tissues were collected and analyzed by RT-PCR and TAS-ELISA. A regenerated non-transformed plant (NT) was used as control for challenge experiments.

### 2.4. Southern and northern blot analyzes of the ihpCP lines

Southern blot was performed to analyze the integrity of the hairpin expression cassette. DNA was extracted from 0.75 g of



**Table 1**

Primers used for cDNA synthesis and PCR amplification of DNA fragments. Used pairs: hpCP1a/hpCP2; hpCP1b/hpCP2; hp54K1a/hp54K2a; hp54K1b/hp54K2b; hp24K1/hp24K2; D/C1; A/B; ihpCP1a/pdk2; ihp54K2a/tocs and ihp24K1/pdk2. Underlined sequences are enzyme restriction sites.

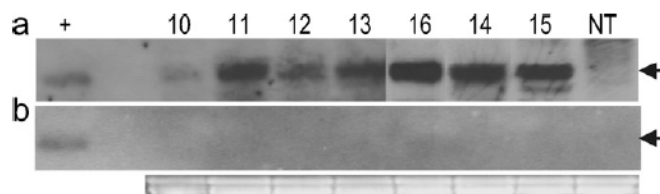
Primer	Nucleotide sequence	Position in the positive strand RNA of CPsV
D	5'CTCAATATGCTTGTGACTGC3'	RNA3(nt522–nt541)
C1	5'TCTTCCATCTGGAGTGAGGC 3'	RNA3(nt1183–nt 1202)
A	5'TAGATCCATGCTCAGTCACC3'	RNA2(nt1402–nt1421)
B	5'TTGACAATGATGGACACTGG3'	RNA2(nt1052–nt1071)
hpCP1a	5'AAGGATCCGAATTCGTTCAAGATGGAGCAAGT3'	RNA3(nt593–nt625)
hpCP1b	5'AATCCTCGAGCTTGTTCAGATGGAGC3'	RNA3(nt593–nt621)
hpCP2	5'CTGGTACCAAGCTTCGAATCCAGCATACCTCA3'	RNA3(nt912–nt943)
hp54K1a	5'AGAATTCGGATCCATAGTAAAGAAGGAGAAC3'	RNA2(nt124–nt155)
hp54K2a	5'CTTAAGCTTGGTACCTACCATTGCCATCTGAC3'	RNA2 (nt511–nt543)
hp54K1b	5'AGCACTCGAGTCCATAGTAAAGAAGG3'	RNA2(nt123–nt149)
hp54K2b	5'GCGAATTCCTACCATTGCCATCTGAC3'	RNA2 (nt517–nt543)
hp24K1	5'AGAATTCGGATCCATGGCTGAATATATAGAAG3'	RNA1 (nt25–nt56)
hp24K2	5'AGGGTACCAAGCTTCGCTCACTGCCATCTG3'	RNA1(nt292–nt324)
Primer	Nucleotide sequence	Non viral
tocs	5'CATTAGAATGAACCGAAACC3'	pHANNIBAL vector
pdk2	5'AATATACAAAGCGCAAGATC3'	

leaves according to Futterer et al. (1995), and aliquots of 20 µg were digested with BamHI, which releases the hairpin expression cassette (Fig. 2a). The digestion products were fractionated in 0.8% TAE agarose gel, and then blotted onto positively charged nylon membranes (Roche). After fixation by baking, membranes were incubated with a digoxigenin-11-dUTP-labelled probe of the hairpin fragments (*hpCP probe*, Fig. 1). The probe was prepared by PCR and hybridization signals were detected by chemiluminescence with the CPD-Star substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

For viral-RNA3 analysis, after infection of ihpCP lines, northern blot hybridizations were performed. Total RNA were extracted from leaves pooled from all replicates of each line according to Bekesiova et al. (1999). Forty microgram of each RNA sample were fractionated by electrophoresis in a 1% (w/v) agarose–formaldehyde denaturing gel in MOPS buffer. Nucleic acids were transferred to a positively charged nylon membrane (Roche). After UV fixation, the membrane was probed with a  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-[dCTP]-labelled fragment from the whole sequence of the *cp* gene (*cp probe*) obtained by Klenow reaction using Ready-To-Go™ DNA-labelling beads (minus dCTP) Amersham kit. Hybridization was performed at 65 °C overnight and signals were detected by autoradiography.

### 2.5. siRNA isolation and detection

For siRNA analysis by northern blot, total RNA was extracted from 1 g of citrus leaves pooled from all replicates of each line using



**Fig. 2.** (a) Southern blot analysis of total DNA extracted from the transgenic ihpCP lines (10–16) and non transgenic (NT) *Citrus sinensis* plants digested with BamHI that releases the hairpin expression cassettes. The nylon membranes were probed with a specific DNA probe of the hairpin *cp* fragment (*hpCP probe*). Plasmid p35S-ihpCP digested with BamHI was used as positive control (+). The arrow indicates the position of the hairpin cassette. (b) Northern blot analysis of total RNA extracted from the same samples shown in panel a. The membrane was hybridized with a specific DNA probe from the complete sequence of the *cp* gene (*cp probe*). The arrow indicates the position of the hairpin mRNA. Ethidium-bromide-stained rRNA is shown as a loading control.

TRIZOL Reagent (Invitrogen). One hundred microgram of RNA from each sample were separated in 15% polyacrylamide gels containing 7 M urea and 0.5× TBE buffer, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche) by a Bio-Rad transfer unit, and later fixed by UV exposure. AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (Epicentre Biotechnologies) was used to generate the <sup>32</sup>P-labelled riboprobe from the hairpin construct ihpCP (*hpCP probe*, Fig. 1) complementary to negative viral RNA. Hybridization was performed at 45 °C overnight and signals were detected by autoradiography.

### 2.6. Virus detection

To test virus infection, TAS-ELISA and RT-PCR were performed for each individual plant during successive flushes. Triple-sandwich immunoassay (TAS-ELISA-HRP) was performed as previously described by Zane et al. (2006) using total protein extracted from 200 mg of leaf tissue. In these experiments samples were considered positive for CPsV when its OD is  $\geq 2.7$  times the healthy control in the TAS-ELISA.

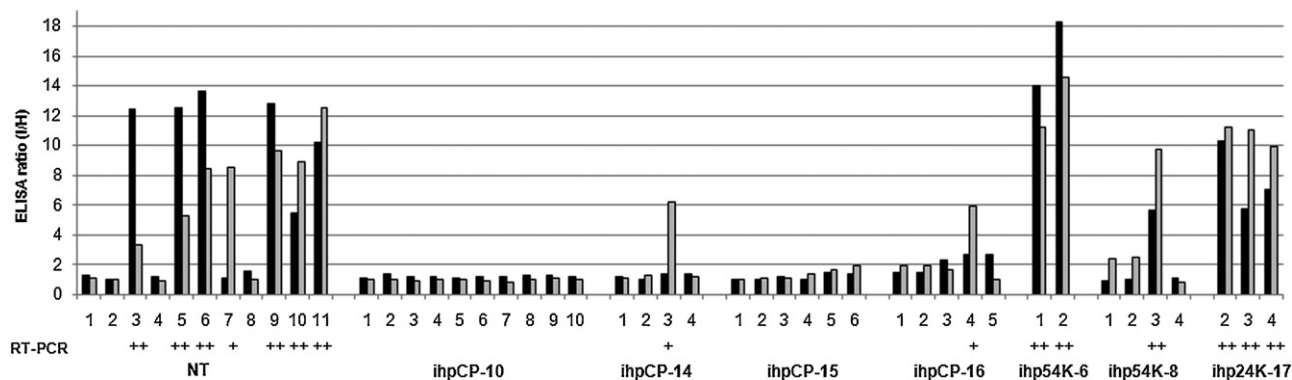
RT-PCR was performed with the primers D/C1 from *cp* gene or A/B from *54k* gene (680 and 369-bp fragment respectively, see Table 1) as described previously (Reyes et al., 2009).

## 3. Results

### 3.1. Sweet orange transformation and analysis of the transgenic lines

Twenty-four independent transgenic lines were generated by *A. tumefaciens*-mediated transformation with the plasmids p35S-ihpCP, p35S-ihp54K and pBin19-ihp24K all of them driven by 35S promoter (Fig. 1). Ten lines (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) carried the ihp54K construct, seven the ihpCP construct (10, 11, 12, 13, 14, 15 and 16) and seven the ihp24K construct (17, 19, 20, 22, 23, 24 and 26). A regenerated shoot without agro-infection was obtained and used as a non transgenic (NT) control. After performing GUS assays or GFP fluorescence observation from small pieces of kanamycin-resistant regenerated shoots, positive scions were grafted in vitro on decapitated seedlings and were tested by PCR to confirm the presence of the inserted gene fragments. Transformation efficiency, calculated as number of transgenic lines per number of inoculated explants, was about 5%.

All transgenic plants displayed normal growth and development, comparable to that shown by non-transgenic controls with



**Fig. 3.** TAS-ELISA evaluation of transgenic lines challenged with CPsV in the first experiment. Analysis of virus accumulation of all replicates of lines 6, 8 (ihp54K); 10, 14, 15, 16 (ihpCP); 17 (ihp24K) and NT (non transgenic control). Black bars first flush, gray bars second flush. The numbers below indicate the replicate number. The ELISA ratio plotted is the average of the ELISA readings of triplicates of the inoculated replicates divided the average ELISA reading of the healthy control. A plant is considered infected when the OD is 2.7 times that of the healthy control. Bottom panel: RT-PCR analysis. Positive (+) samples are indicated.

the exception of all replicates of line ihp54K-8 which were smaller and had slightly curved branches with variable distances between internodal segments that were frequently shorter. Fig. 2a shows the integrity of the transgene expression cassette in the seven transgenic ihpCP lines, as corroborated by southern blot. The expected size of the entire ihpCP cassette was found in all the lines and they had integrated between one and three copies of the transgene (data not shown). The hairpin mRNA was not detected by northern blot (Fig. 2b) suggesting that it is processed by the PTGS machinery rendering siRNA (see Section 3.3.).

### 3.2. Challenge of the sweet orange ihpCP, ihp54K and ihp24K lines with CPsV

To investigate the response of the transgenic plants against viral infection we performed a first challenge experiment of lines ihp54K-6 and -8, ihpCP-10, -14, -15, and -16, and ihp24K-17 with the Argentine CPsV 90-1-1 isolate by graft inoculation of infected tissue. Between 4 and 10 replicates of each line were analyzed. After flushing, the presence of the virus was determined individually by RT-PCR using the RNA 2 primers A/B (Table 1). In order to obtain quantitative measure of viral multiplication in new leaves, TAS-ELISA was applied to every replicate throughout four successive flushes during 4 months. In all cases, TAS-ELISA results were consistent with RT-PCR results.

ELISA values were always expressed as a ratio of inoculated replicates to healthy, NT non-inoculated controls. OD values of the replicates of ihp54K-6, and ihp24K-17 lines in the first and second flushes were similar or even higher than those of the infected NT control (Fig. 3). Line ihp54K-8 gave variable results with some of the replicates being positive and some negative by TAS-ELISA. RT-PCR analysis (Fig. 3) also confirmed TAS-ELISA results in the assayed lines ihp54K and ihp24K. Symptoms in infected replicates of ihp54K-6 line were indistinguishable from those observed in the infected control plants that showed flecking, spots and a shock reaction of the new shoots. Line ihp24K-17 showed more severe symptoms with respect to the infected control plants in all of the inoculated replicates in the first two flushes analyzed. Normally, in the successive flushes of a CPsV-infected control plant, the symptoms and the viral accumulation decrease respect to these first two flushes. In order to observe the behavior of these lines over a longer period, TAS-ELISA was performed for the third and fourth flushes (data not shown) and all the lines maintained the resistance – susceptibility behavior of the first and second flushes.

Replicate plants from lines ihpCP (10, 14, 15 and 16) where negative by TAS-ELISA and RT-PCR in the first flush (Fig. 3). Symptoms did not develop in any of the individual replicate plants in the first

flush confirming a good level of resistance acquired by these lines. In the second flush, one of four replicates of ihpCP-14 (replicate 3) and one of five replicates of ihpCP-16 (replicate 4) that were non-infected in the first flush, tested positive by TAS-ELISA. However, these two lines were challenged in a second experiment (see below) and all replicates from line 14 were negative in the flushes analyzed and only one replicate of ten from line 16 had a higher TAS-ELISA reading. No viral accumulation was detected in all replicates of lines ihpCP-10 and ihpCP-15 throughout first to fourth flushes completing 4 months of analysis. These results strongly suggest that transgenic ihpCP lines are resistant to CPsV infection. In addition, these plants were kept in the greenhouse, and after one year still did not show any symptom of psorosis further confirming this hypothesis.

To further evaluate the CPsV – resistant phenotype of the lines, a second challenge was performed including ten lines. Six lines were previously assayed in the first experiment and other four lines were added. In this experiment, a higher number of replicates were tested per line, 10 replicates of each line were inoculated, and 2 replicates were kept as negative controls. The included lines were, ihpCP-10, -11, -12, -14, -15 and -16, ihp54K-8 and -9 and ihp24K-17 and -19. Table 2 shows the number of replicates that expressed the characteristic symptoms of psorosis in the first three flushes. Clearly, except for the line ihpCP-11, all the replicates from ihpCP lines did not show symptoms in all successive observations. Lines ihp54K and ihp24K expressed symptoms of infection.

Only TAS-ELISA was used for all replicates in this experiment since RT-PCR was consistent with it in the first experiment. OD values for the replicates of lines ihp54K-8 and -9 in the first flush were from 1 to 2 times the NT control (Fig. 4). However, the presence of symptoms indicated that all replicates of these two lines were infected (Table 2 and Fig. 5). In the second flush, the OD values for line 8 were variable, and only two replicates were positive. In the case of line 9, values increased in almost all replicates but there were also variability among them. Replicates of lines ihp24K-17 and -19 had average OD values ranging from 3.0 to 3.2 in the first and second flushes and showed flecking and spots in all replicates (Table 2 and Fig. 5).

Lines ihpCP-10, -12, -14, -15 and -16 had very low OD values, ranging from 0.5 and 1.7 times the healthy control, in the first two flushes (Fig. 4) with the exception of one replicate (16-3) that had a value of 2.6 times the healthy control. However, no symptoms were observed in any of the replicates (Table 2 and Fig. 5). We also analyzed these lines in a third flush and they remained with the same resistant behavior. The complete absence of symptoms and the ELISA readings similar to the non inoculated plants in the two independent experiments led us to hypothesize that all ihpCP lines

**Table 2**

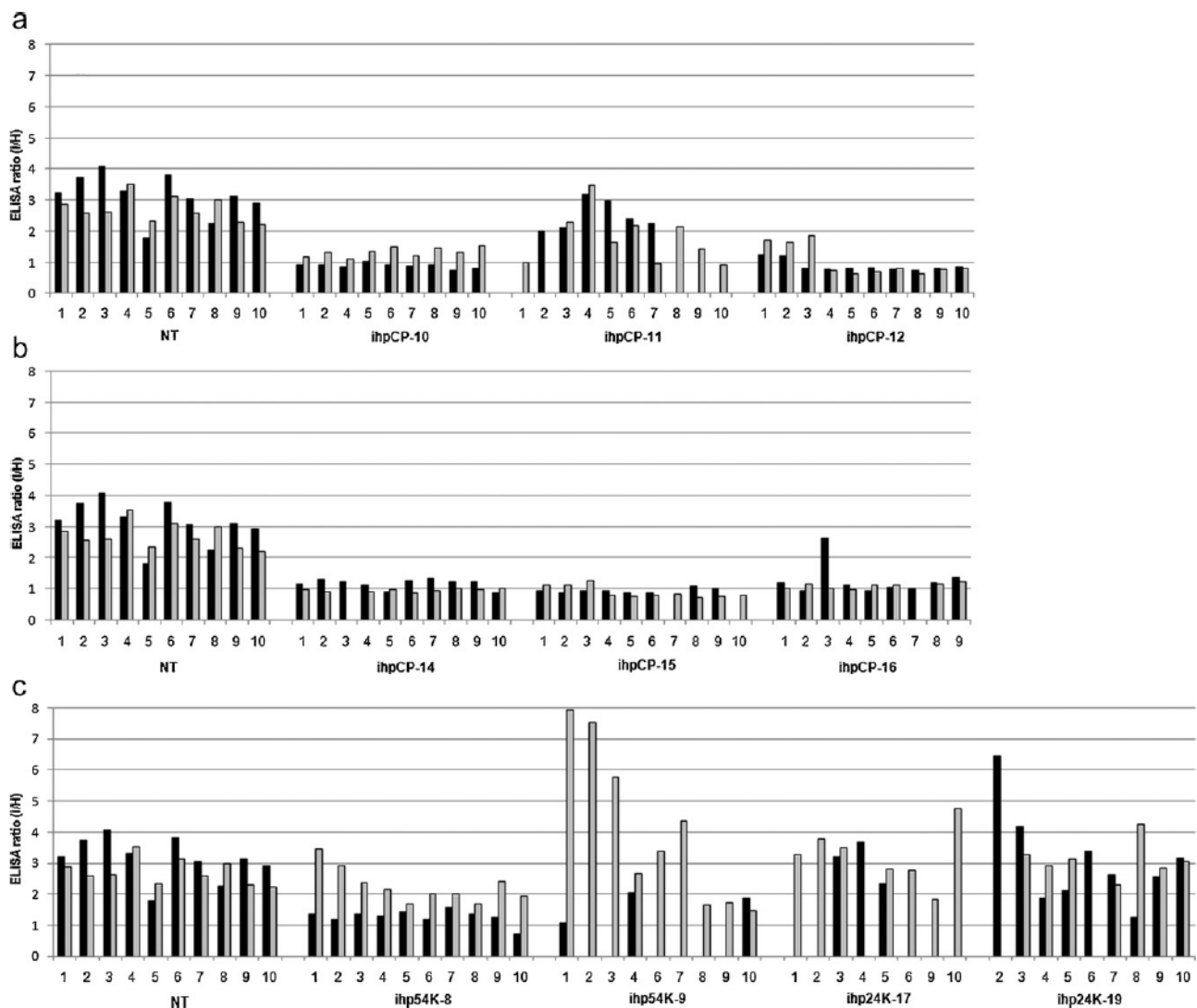
CPsV symptom development in transgenic sweet orange lines over three flushes of the second challenge experiment. Number of seedlings of the transgenic lines showing: F: flecking, SP/V: spot and variegated, S: shock, ns: no shoot.

Lines	First flush				Second flush				Third flush			
	F	SP/V	S	ns	F	SP/V	S	ns	F	SP/V	S	ns
NT	5	9	2	0	4	6	0	0	0	8	0	0
ihp54K-8	7	3	0	0	5	3	0	0	0	0	0	0
ihp54K-9	1	1	9	8	3	6	3	1	0	5	2	0
ihpCP-10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ihpCP-11	4	4	8	3	5	6	3	0	0	9	0	0
ihpCP-12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ihpCP-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ihpCP-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ihpCP-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ihp24K-17	2	2	9	6	2	3	4	2	0	4	4	0
ihp24K-19	5	6	5	1	3	4	1	1	0	6	1	1

were resistant to the virus. The only exception was line ihpCP-11 which was infected with CPsV, showing marked symptoms (Table 2 and Fig. 5), and giving OD values similar to the positive control (inoculated NT plants). As mentioned before the integrated copies of the transgene were between 1 and 3 and there was no correlation between this number and virus resistance in the six ihpCP lines.

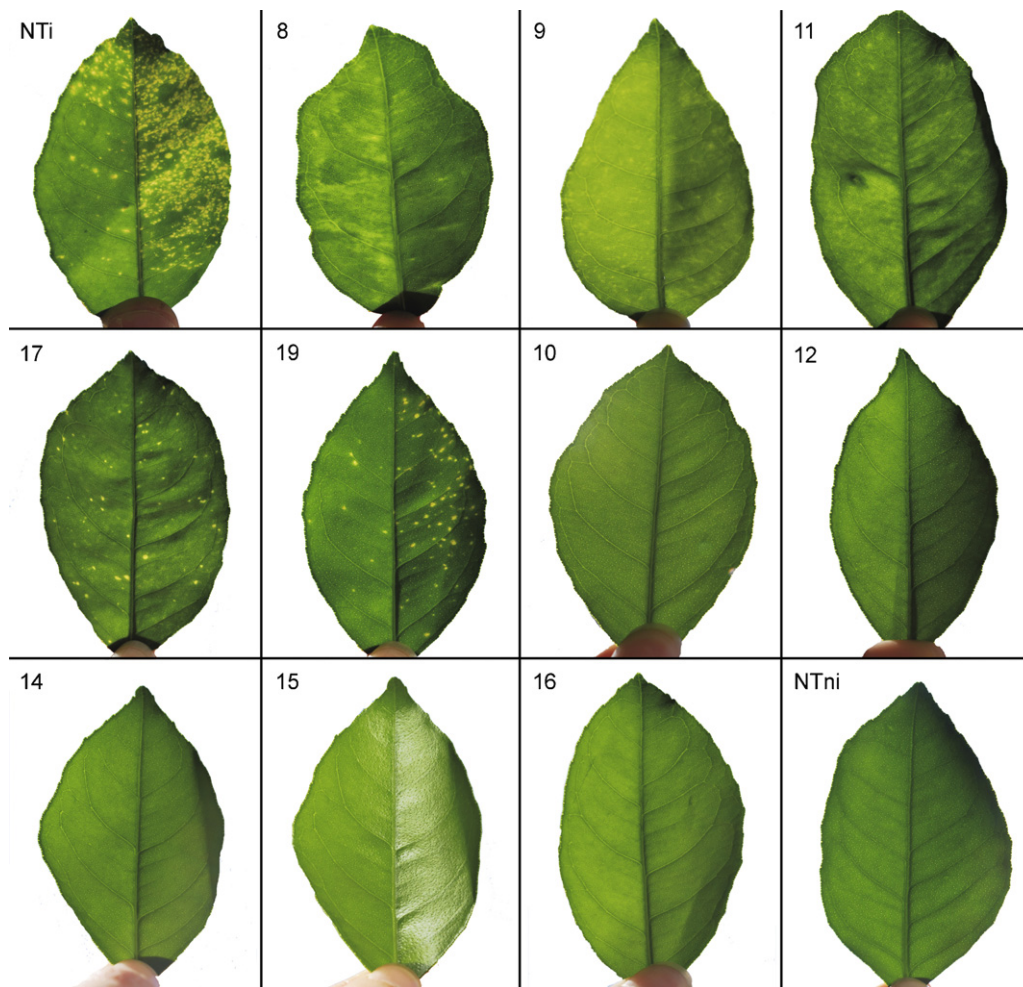
### 3.3. Molecular analysis of viral RNA accumulation and specific siRNA in ihpCP transgenic sweet orange plants

To investigate the protective mechanism of transgenic plants against subsequent CPsV infection, we analyzed viral RNAs and siRNA accumulation in ihpCP lines before and after CPsV challenge.



**Fig. 4.** TAS-ELISA evaluation of transgenic lines challenged with CPsV in the second experiment. Analysis of virus accumulation in replicates of lines ihpCP-10, -11 and -12 (a); -14, -15 and -16 (b); ihp54K-8 and -9, ihp24K-17 and -19 (c). NT (non transgenic control). Black bars first flush, gray bars second flush. The numbers below indicate the replicate number. The ELISA ratio plotted is the average of the ELISA readings of triplicates of the inoculated replicates divided the average ELISA reading of the healthy control.

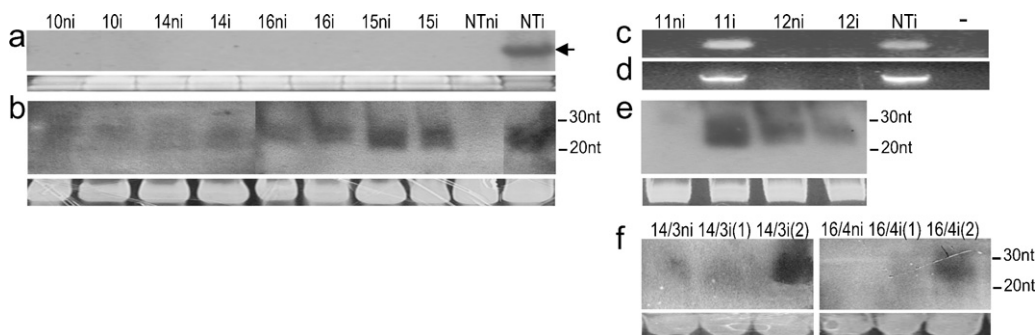




**Fig. 5.** Symptoms developed in representative leaves from challenged transgenic lines ihp54K-8 and -9, ihpCP-11, ihp24K-17 and -19 (susceptible lines), ihpCP-10, -12, -14, -15 and -16 (resistant lines) inoculated with CPsV 90-1-1 isolate. NTi and NTni refer to inoculated and non-inoculated controls.

Since CPsV is a multipartite virus, we quantified the presence of the more abundant viral RNA 2 and RNA 3 in order to determine if degradation of the RNA 3 by the ihpCP transgene expression would also affect the accumulation of the RNA 2. Neither RNA 2 nor RNA 3 was detected in the resistant ihpCP-lines; -10, -12,

-14, -15 and -16 by RT-PCR (Fig. 3) and northern blot analyzes (Fig. 6a, c and d) after inoculation indicating the CPsV was not able to accumulate in these lines. Susceptible line ihpCP-11 showed to be positive for RNA 2 and RNA 3 by RT-PCR (Fig. 6c and d).



**Fig. 6.** (a) Northern blot analysis of total RNA extracted from transgenic *Citrus sinensis* CPsV-inoculated (i) and non inoculated (ni) ihpCP lines (10, 14, 15 and 16) and from non transgenic (NT) plants. The membrane was hybridized with a specific DNA probe from the *cp* gene (*cp* probe). The arrow indicates the position of the viral CPsV RNA 3. (b) Northern blot analysis of low-molecular weight RNA extracted from the same samples shown in panel a. (c) RT-PCR amplification of RNA 3 fragments using D/C1 primers (Table 1) from transgenic *Citrus sinensis* CPsV-inoculated and non-inoculated ihpCP lines (11 and 12) and from non transgenic (NT) plants. (d) RT-PCR amplification of RNA 2 fragments using A/B primers (Table 1) from the same samples shown in panel c. (e) Northern blot analysis of low-molecular weight RNA extracted from the same samples shown in panel c. (f) Northern blot analysis of low-molecular weight RNA extracted from non-inoculated (ni) and inoculated individual replicates (14-3 and 16-4) in the first (1) and second (2) flush of the first challenge experiment. The membranes for low-molecular RNA detection were hybridized with a specific positive transcript for the CP-hairpin sequence (*hpCP* probe) to detect the negative siRNA strand. The DNA oligomers (20 mer and 30 mer) that were used as size controls are indicated. Ethidium-bromide-stained rRNA is shown as a loading control.



siRNA accumulation was analyzed by northern blot for the first flush of transgenic inoculated and non-inoculated lines. RNA was extracted from a pool of leaves collected from all the replicates of each line. Samples from inoculated and non-inoculated NT plants were also analyzed in parallel. siRNA accumulation was variable among lines. Lines ihpCP-12, -15 and -16 exhibited high and similar accumulation of these 21–25-nt species whereas lines -10 and -14 showed much lower levels of siRNA (Fig. 6b and e). These results were confirmed in three independent northern blots. There was no difference in siRNA accumulation levels between non-inoculated and inoculated plants of each five resistant ihpCP lines. Susceptible non inoculated line ihpCP-11 showed no siRNA accumulation, but the inoculated ihpCP-11 plants showed very high levels of them, similar to the siRNAs derived from control NT inoculated plants.

As mentioned before, a single replicate of the lines ihpCP-14 and -16 that were negative for the virus in the first flush became infected in the second flush of first experiment. Samples from these two plants were also analyzed by northern blot, showing that siRNA levels increased significantly in the second flush of these plants with respect to the first one (Fig. 6f).

#### 4. Discussion

Recently, we reported that the expression of self-complementary, hairpin RNA fragments from the coat protein (*cp*) and *54k* genes of the Argentine CPsV 90-1-1 isolate confer resistance to Citrus psorosis virus on *Nicotiana benthamiana* plants (Reyes et al., 2009), and that the construct derived of the *cp* gene was much more efficient in the generation of that resistance. Those results encourage us to test these hairpin constructs for the transformation of citrus plants.

The results of many investigations have been consistent with the idea that not all regions of the viral genome yield the same results when a pathogen-derived-resistance strategy is applied (Valkonen et al., 2002). For negative-stranded viruses like tospovirus, replication is regulated by the CP concentration at the point of switching from mRNA production to replication of the genome (Storms, 1998). Working with *Tomato spotted-wilt virus* (TSWV), Prins et al. (1996) reported resistance of engineered plants to infection only when the transgene sequence was derived from the sequences encoding the nucleocapsid protein N and the movement protein NSm (components of the ribonucleoprotein complex), but not from other genes of the viral genome. This result was explained as the elimination of the TSWV genome protection provided by the ribonucleoprotein complex in the silenced transgenic lines. Likewise, for the case of CPsV the *cp* gene is targeted by PTGS in the ihpCP lines and the encapsidation mechanism would be rendered nonviable leaving the naked RNA fragments as easy targets for degradation. Besides encapsidation, other unknown CP functions like PTGS suppression, or its involvement in the regulation of viral RNA expression could be impeded in the transgenic ihpCP lines.

The ihpCP-mediated resistance by PTGS could also be related to the accessibility or abundance of target mRNA in hairpin expressing cells (Helliwell and Waterhouse, 2003). Higher representation of the *cp* mRNA may allow easier or faster PTGS triggering and amplification. Nevertheless, *54K* mRNA is also well represented in CPsV-infected cells (Sánchez de la Torre et al., 1998), but ihp54K does not trigger an efficient PTGS-mediated resistance response. These data suggest that the hypothesis about the avoidance of CP function is the most applicable to the CPsV system.

The PTGS induction in the ihpCP lines was analyzed through the determination of RNA 3-derived siRNA accumulation without a good correlation between siRNA level and resistance among lines (see Fig. 6b). This behavior was also observed in PTGS-mediated resistance against other viruses (Domínguez et al., 2002; Kalantidis

et al., 2002; Missiou et al., 2004; Batuman et al., 2006; Fagoaga et al., 2006; Febres et al., 2008; López et al., 2010) indicating that other yet unknown factors affect the ultimate resistance gained by the plants. However, pre-activation of the RNA-silencing machinery and a certain minimum accumulation level of siRNA molecules targeting the viral genome have been found to be key factors for creating virus-resistant plants. This can be confirmed by the fact that the only non-resistant line ihpCP-11 had undetectable levels of transgene-derived siRNA prior to the inoculation (Fig. 6e), probably due to a transcriptional silencing of the transgene.

In the non-inoculated plants of the ihpCP-resistant lines, siRNAs were generated only from the hairpin transcript, but in the inoculated plants, they could come from either this transgene or the viral RNA3 replicating in the cell and later processed by the PTGS machinery. However, no significant difference in siRNA accumulation was observed between inoculated and non-inoculated resistant plants. It is possible that in those plants, the virus is controlled and limited to tissues near the site of infection (graft). It could also be the case that the accumulation of viral RNA in inoculated, resistant plants is not sufficient to make a significant quantity of siRNAs derived from virus degradation, possibly because this happens as soon it enters the cell. The outermost cells of the graft tissue would have received the systemic signal, which makes the virus degrade and not multiply in them. As the material used for northern blot analysis came from a group of randomly selected leaves, far from the grafting site, siRNA will be mostly derived from the transgene and would not reveal differences in siRNA accumulation between non inoculated and inoculated tissue. For the single replicates that were infected in the second flush of the first experiment (14-3 and 16-4), the virus multiplied and overcame the PTGS mechanism, and could have progressed faster than the systemic signal (Mlotshwa et al., 2008). The active multiplication of the virus in those tissues far from the inoculation site leads to an increase in the fraction of virus-derived siRNA and consequently to a higher total siRNA accumulation.

Virus induced gene silencing mechanism (VIGS) is evidenced by the presence of specific siRNA for RNA1, RNA2, and RNA3 of CPsV in infected plants (Velázquez et al., 2010). We also observed VIGS induction through *cp* specific siRNA accumulation in the inoculated NTi plants (Fig. 6b). Similar results were also obtained by Fagoaga et al. (2006) for CTV infection in Mexican lime and by Febres et al. (2008) for the infection of grapefruit with the same virus, confirming that there is a significant accumulation of siRNA derived only from the infection in non-transgenic plants. CPsV inoculated plants induce PTGS as a means of defence. However, this phenomenon would not be sufficient to control infection, such as when using a strong inducer of silencing as double-stranded RNA (hairpin). One possible explanation to this is a need for the mechanism to be effective or being induced well before plant inoculation, as in the case of transgene expressed in ihpCP lines.

This article reports for the first time engineered PTGS-mediated highly resistance in a woody plant against a negative virus using an ihpRNA derived from the coat protein gene. IhpCP-transgenic plants could be an efficient alternative to eradicate psorosis in the field. The sweet orange plants must be assayed under field conditions to analyze longer term response to natural infection.

#### Acknowledgements

We wish to thank Drs. Carmelo López, L.W. Timmer and Adrián Sambade for helpful discussion and manuscript revision and Pto. Agr. Fabián Ramos for greenhouse work. M.L. García, Carina A. Reyes, Agustina De Francesco and Eduardo J. Peña, belong to the staff of Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas UNLP. M.L. Garcia is recipient of the research career

award from CONICET. Carina A. Reyes and Agustina De Francesco are fellows of CONICET. This work was supported by grants from BID802 OC-AR PICT 11714 and PICT 32359 ANPCyT and PIP 6108 CONICET.

## Appendix A. : Genebank accession numbers

CPsV 90-1-1 RNA3 hairpin fragment: FJ495195.  
CPsV 90-1-1 RNA2 hairpin fragment: FJ495196.  
CPsV 90-1-1 RNA1 hairpin fragment: HM590775.

## References

- Almeida, R., Allshire, R.C., 2005. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.* 15, 251–258.
- Anderson, C., 2000. Presentation on the Argentinean certification program. GCGN Meeting, <http://www.crec.ifas.ufl.edu/societies/ISC/gcgn/WG.3.PDF>.
- Batumian, O., Mawassi, M., Bar-Joseph, M., 2006. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to Citrus tristeza virus sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* 33, 319–327.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–363.
- Bekesiova, I., Nap, J.P., Mlynarova, L., 1999. Isolation of high Quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17, 269–277.
- Beñatena, H.N., Portillo, M.M., 1984. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Dodds (Eds.), *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV*. University of California, Riverside, pp. 159–164.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., Sheen, J., 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6, 325–330.
- Domínguez, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., Peña, L., 2002. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Mol. Breed.* 10, 1–10.
- Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2010. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 14, 912–916.
- Fagoaga, C., López, C., de Mendoza, A.H., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L., 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Mol. Biol.* 60, 153–165.
- Fahim, M., Ayala-Navarrete, L., Millar, A.A., Larkin, P.J., 2010. Hairpin RNA derived from viral *Nla* gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. *Plant Biotechnol. J.* 8, 1–14.
- Febres, V.J., Lee, R.F., Moore, G.A., 2008. Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. *Plant Cell Rep.* 27, 93–104.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358–363.
- Futterer, J., Gisel, A., Iglesias, V., Kloti, A., Kost, B., Mittelsten Scheid, O., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G., Wang, Z.Y., 1995. Standard molecular techniques for analysis of transgenic plants. In: Potrykus, I., Spangenberg, G. (Eds.), *Gene Transfer to Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 215–262.
- García, M.L., Dal Bó, E., Grau, O., Milne, R.G., 1994. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J. Gen. Virol.* 75, 3585–3590.
- Gura, T., 2000. A silence that speaks volumes. *Nature* 404, 804–808.
- Helliwell, C., Waterhouse, P., 2003. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30, 289–295.
- Hily, J.M., Ravelonandro, M., Damsteegt, V., Bassett, C., Petri, C., Liu, Z., Scorza, R., 2007. Plum pox virus coat protein gene intron-hairpin-RNA (ihpRNA) constructs provide resistance to Plum pox virus in *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132, 850–858.
- Kalanditis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., Tsagris, M., 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 826–833.
- Kreuze, J.F., Klein, I.S., Lazaro, M.U., Chuquiyuri, W.J., Morgan, G.L., Mejía, P.G., Ghislain, M., Valkonen, J.P., 2008. RNA silencing-mediated resistance to a crinivirus (Closteroviridae) in cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) and development of sweet potato virus disease following co-infection with a potyvirus. *Mol. Plant Pathol.* 9, 589–598.
- López, C., Cervera, M., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., Peña, L., 2010. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime. *Mol. Plant Pathol.* 11, 33–41.
- Martín, S., García, M.L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., Grau, O., Alioto, D., Moreno, P., Guerri, J., 2006. Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J. Gen. Virol.* 87, 3097–3102.
- Milne, R.G., García, M.L., Moreno, P., 2003. Citrus psorosis virus. In: *Association of Applied Biologists (AAB), Descriptions of Plant Viruses*, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=401>.
- Missiou, A., Kalanditis, K., Boutla, A., Tzortzakaki, S., Tabler, M., Tsagris, M., 2004. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol. Breed.* 14, 185–197.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Vance, V., 2008. Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci.* 13, 375–382.
- Naum-Onganía, G., Gago-Zachert, S., Peña, E., Grau, O., García, M.L., 2003. Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res.* 96, 49–61.
- Peña, L., Cervera, M., Juárez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Durán-Vila, N., Navarro, L., 1995. High efficiency Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci.* 104, 183–191.
- Prins, M., Resende Rde, O., Anker, C., van Schepen, A., de Haan, P., Goldbach, R., 1996. Engineered RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus is sequence specific. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 416–418.
- Prins, M., Laimer, M., Norris, E., Schubert, J., Wassenecker, M., Tepfer, M., 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 9, 73–83.
- Reyes, C.A., Peña, E.J., Zaneck, M.C., Sanchez, D.V., Grau, O., García, M.L., 2009. Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. *Plant Cell Rep.* 28, 1817–1825.
- Roistacher, C.N., 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. In: *Handbook for Detection and Diagnosis*. Food and Agriculture Organization of the United Nations F.A.O., Rome, Italy, pp. 115–126.
- Roistacher, C.N., 1993. Psorosis—a review. In: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. (Eds.), *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV*, University of California, Riverside, pp. 139–154.
- Sánchez de la Torre, M.E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O., García, M.L., 1998. The top component of Citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Mol. Plant Pathol.*, On-line <http://www.bspp.org.uk/mpol/1998/1019sanchez/index.htm>.
- Sánchez de la Torre, E., López, C., Grau, O., García, M.L., 2002. RNA2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *J. Gen. Virol.* 83, 1777–1781.
- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K., Ravelonandro, M., 2001. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res.* 10, 201–209.
- Shimizu, T., Yoshii, M., Wei, T., Hirochika, H., Omura, T., 2009. Silencing by RNAi of the gene for Pns12, a viroplasm matrix protein of Rice dwarf virus, results in strong resistance of transgenic rice plants to the virus. *Plant Biotechnol. J.* 7, 24–32.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M., 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319–320.
- Storms, M.M.H., 1998. The role of NSs during tomato spotted wilt virus infection. PhD Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., Kilby, N.J., 2004. Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Mol. Biol.* 54, 157–174.
- Swingle, W.T., Webber, H.J., 1896. The principal diseases of citrus fruits in Florida. *USDA Div. Veg. Physiol. Pathol. Bull.* 8.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T., 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J.* 24, 3147–3157.
- Valkonen, J.P., Rajamäki, M.L., Kekarainen, T., 2002. Mapping of viral genomic regions important in cross-protection between strains of a potyvirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 683–692.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Fagard, M., 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 114, 3083–3091.
- Velázquez, K., Renovell, M., Comellas, P., Serra, M., García, M.L., Pina, J.A., Navarro, L., Moreno, P., Guerri, J., 2010. Effect of temperature on RNA silencing of a negative-stranded RNA plant virus: Citrus psorosis virus. *Plant Pathol.* 59, 982–990.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D.C., 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95, 177–187.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., Waterhouse, P.M., 2001. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* 27, 581–590.
- Zaneck, M.C., Peña, E., Reyes, C.A., Figueroa, J., Stein, B., Grau, O., García, M.L., 2006. Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J. Virol. Methods* 137, 245–251.
- Zaneck, M.C., Reyes, C.A., Cervera, M., Peña, E.J., Velázquez, K., Costa, N., Plata, M.I., Grau, O., Peña, L., García, M.L., 2008. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep.* 27, 57–66.